

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR HUMANGENETIK
PROF. DR. BERNHARD WEBER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Sterile alpha motif containing 7 (Samd7) is a novel Crx-
regulated transcriptional repressor in the retina**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Julia Hlawatsch

2013

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR HUMANGENETIK
PROF. DR. BERNHARD WEBER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Sterile alpha motif containing 7 (Samd7) is a novel Crx-
regulated transcriptional repressor in the retina**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Julia Hlawatsch

2013

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Langmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Herbert Jägle

Tag der mündlichen Prüfung: 15. November 2013

Inhalt

1.	Einleitung.....	2
2.	Material und Methoden.....	4
2.1.	Mauslinien und Haltung.....	4
2.2.	DNA-Konstrukte	4
2.3.	Immunhistochemie	5
2.4.	Immunzytochemie	6
2.5.	Western Blot Analyse	6
2.6.	In vitro Elektroporation und Kultur von Netzhautgewebe	7
2.7.	Transiente Transfektion, Luciferase- und β -Gal-Assays	8
2.8.	RNA-Isolation, RT-PCR und quantitative (real-time) RT-PCR.....	8
3.	Ergebnisse	10
3.1.	Klonierung von murinem Samd7	10
3.2.	Samd7-Expression in der murinen Retina und Epiphyse	12
3.3.	Samd7-Lokalisation in der äußeren Körnerschicht sowie im Zytoplasma und im Kern transfizierter Zellen.....	13
3.4.	Kontrolle der Samd7-Transkription durch Crx	16
3.5.	Samd7 als Transkriptionsrepressor.....	19
4.	Diskussion	21
4.1.	Samd7, das neu charakterisierte Protein mit einer SAM-Domäne.....	21
4.2.	Samd7 und sein phylogenetisch engster Verwandter Samd11	21
4.3.	Samd7, ein Crx-Zielgen.....	22
4.4.	Samd7, ein Transkriptionsregulator ohne DNA-Binderegion	22
4.5.	Samd7 und seine Rolle in der retinalen Genexpression als Ziel zukünftiger Studien	23
5.	Literaturverzeichnis	24
6.	Abkürzungen	28

1. Einleitung

Stäbchen und Zapfen sind hochspezialisierte Zellen der Netzhaut. Durch Umwandlung von Lichtreizen in elektrische Signale (sogenannte Fototransduktion) spielen sie eine entscheidende Rolle in der visuellen Wahrnehmung. Bis heute wurden mehr als 170 Krankheitsgene identifiziert, die zu einer Dysfunktion der Netzhautzellen und fortschreitender Degeneration der Netzhaut führen (Retnet database, <http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/>). Innerhalb dieser großen Gruppe von Krankheitsgenen sind es häufig Defekte in netzhautspezifischen Genen und Transkriptionsfaktoren, die mit vererbbaaren Netzhautdystrophien in Zusammenhang stehen [1]. Dabei gibt es eine starke Korrelation zwischen einem hohen Transkriptionslevel eines Fotorezeptorgens und der Dysfunktion seines korrespondierenden Proteins, was in der Folge zur Erkrankung der Retina führt [2]. Aus diesem Grund kann die Identifikation stark exprimierter retinaler Gene und die Kenntnis ihrer Regulation helfen, bisher unbekannte genetische Defekte der Netzhaut zu erkennen und zu verstehen.

Fotorezeptorspezifische Gene werden durch hierarchisch strukturierte Transkriptionsfaktoren kontrolliert. Dazu gehören orthodenticle homeobox 2 (Otx2) [3], cone rod homeobox (Crx) [4, 5], neural retina leucine zipper (Nrl) [6], nuclear receptor subfamily 2 group E member 3 (Nr2e3) [7], thyroid hormone receptor beta 2 (Thrb2) [8] und retinoid related orphan receptor beta (Rorβ) [9]. Von Relevanz ist hierbei insbesondere Crx, welches die Transkription fast aller fotorezeptorspezifischen Gene entscheidend beeinflusst und sowohl in der Entwicklung von Stäbchen und Zapfen als auch nach deren Ausreifung eine zentrale Rolle spielt [10]. Es fungiert als sogenanntes „terminal selector gene“, da es den vollständig differenzierten Zustand der Stäbchen und Zapfen erhält und kontrolliert [11]. ChIP-seq-Experimente in der murinen Retina zeigten, dass Crx die Expression hunderter Fotorezeptorgene beeinflusst, insbesondere auch die der meisten Krankheitsgene der Retina [12]. Auf Grundlage dieser ChIP-seq-Daten konnten in einer Kandidatengen-Priorisierung zwei neue Retinitis pigmentosa Gene identifiziert werden, FAM161A und MAK [13, 14]. Folglich haben sich die Crx-ChIP-seq-Daten als sehr hilfreich erwiesen, bisher unbekannte netzhautspezifische Gene zu identifizieren und neue Ziele für Genanalysen zu definieren.

Ein bisher nicht charakterisiertes Gen, das mit zwei signifikanten Crx-Peaks um seinen Locus

in der ChIP-seq-Studie ebenfalls auf sich aufmerksam machte, ist Samd7. Das Samd7-Protein enthält eine sogenannte sterile alpha motif (SAM) Domäne. SAM-Domänen sind 70 Aminosäuren lange Protein-Protein-Interaktionsdomänen. Diese Domänen sind in unterschiedlichen Proteinen verschiedener funktioneller Klassen enthalten [15]. Die Proteine interagieren oft über ihre SAM-Domänen und formen polymetrische Komplexe, wodurch eine Modulation der funktionellen Aktivität möglich wird [16]. SAM-Proteine fungieren als Kinasen [17], regulatorische Enzyme [18], Gerüstproteine [19], RNA-Bindeproteine [20, 21] und Transkriptionsfaktoren [22, 23]. Der Ets Transkriptionsfaktor Yan beispielsweise enthält eine SAM-Domäne und ist ein negativer Regulator der Fotorezeptorentwicklung [24]. Major retinal SAM domain protein (mr-s, alias Samd11) war das erste identifizierte Protein mit einer (einzelnen) SAM-Domäne, welches überwiegend in Stäbchen und in der Epiphyse exprimiert wird [25]. Es wird von Crx reguliert und fungiert als Transkriptionsrepressor in der Entwicklung von Fotorezeptoren [25].

In dieser Arbeit erfolgte nun die Klonierung und Charakterisierung von Samd7. Es ist das bisher zweite identifizierte Protein mit einer SAM-Domäne, welches spezifisch in der Netzhaut von Säugetieren exprimiert wird. Samd7 ist auf die äußere Körnerschicht der sich entwickelnden und ausgereiften murinen Retina begrenzt. Seine Transkription wird durch Crx-bindende cis-regulatorische Elemente kontrolliert. Es zeigte sich, dass Samd7 vor allem im Kern der Zelle lokalisiert ist, wo es die Crx-abhängige Transkription von netzhautspezifischen Promotoren, einschließlich der des Retinoschisin-Gens und des Samd7-Gens selbst, hemmt. Diese Ergebnisse schreiben Samd7 eine bisher unbekannte Rolle in der transkriptionellen Regulation von retinaspezifischen Genen zu.

2. Material und Methoden

2.1. Mauslinien und Haltung

Die verwendeten Mauslinien mit CD1 und C57BL/6 Hintergrund stammten aus den Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland). Sie wurden in einem zwölf Stunden Tag/Nacht-Rhythmus bei 22°C und freiem Zugang zu Wasser und Nahrung gehalten. Der Gesundheitszustand der Tiere wurde kontinuierlich überwacht und alle Vorgänge wurden durch die Tierschutzkommission der Universität Regensburg genehmigt und standen im Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz sowie dem Institute for Laboratory Animal Research Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 1999.

2.2. DNA-Konstrukte

Zur Amplifikation des vollständigen offenen Leserasters von Samd7 wurde cDNA der murinen Netzhaut verwendet. Als Vorwärtsprimer diente 5'-cccaagcttatgacaaaccaatgatgtctgtgag-3' und als Rückwärtsprimer 5'-cccgaattcttaattctcataacgtcttgctcag-3'. Das PCR-Produkt wurde in den pFLAG-CMV-4-Vektor (Sigma Aldrich) an die Restriktionsstellen *Hind*III und *Eco*RI subkloniert. Die Validierung des Klonierungsprodukts erfolgte durch Cycle-Sequencing mit vektorspezifischen, internen Primern. Die pCAG-GFP- und no-basal/Rho-basal dsRed-Vektoren wurden bereits beschrieben [12], ebenso der RNAi-Vektor pBS/U6-Crx-shRNA [26]. Das Plasmid pLKO.1 scramble shRNA wurde von Addgene (Cambridge, MA, USA) bezogen. Um das Samd7-CBR1-dsRed-Konstrukt zu erhalten, wurde mittels PCR ein Bereich von 495bp der murinen Samd7-Promotorregion amplifiziert. Als Vorwärtsprimer diente dabei 5'-tccccggaattcgcccattctcacctagagca-3' und als Rückwärtsprimer 5'-ttcggggtaccgcccttgctgacagctctt-3'. Das Promotorfragment wurde vor dsRed in den no-basal Reporter-Vektor subkloniert. Als Restriktionsenzyme wurden dabei *Eco*RI und *Kpn*I verwendet. Das 581bp Insert des Samd7-CBR2-dsRed-Konstrukts wurde aus muriner DNA amplifiziert. Folgende Primer kamen dabei zum Einsatz: Vorwärtsprimer 5'-tcccctctagagatgtgggcaactcaaacct-3', Rückwärtsprimer 5'-tccccggaattcagacagccactctggatggt-3'. Das Intronfragment wurde in den Rho-basal

Reporter-Vektor an die Restriktionsstellen *Xba*I und *Eco*RI subkloniert. Durch zielgerichtete Mutagenese mit dem QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) wurde das zentrale Kernmotiv der Crx-Bindestellen innerhalb der Crx-bindenden Region 2 (CBR2) ausgetauscht. Konkret wurden dabei die Nukleotide TAAT durch CCCC ersetzt. Für die Mutagenese wurden folgende Primer verwendet:

CBR2/CBS1, Vorwärtsprimer 5'-cgtctgaaggcagcgccccaggcattctcat-3', Rückwärtsprimer 5'-aggatgaagatgcctggggcgctgccttcag-3',

CBR2/CBS2, Vorwärtsprimer 5'-catcttcattctgccccctgctggccatccag-3', Rückwärtsprimer 5'-ggatggccagcacgggggcaggatgaagatgcc-3',

CBR2/CBS3, Vorwärtsprimer 5'-ggccatccaggccccgagctctgggtcagag-3', Rückwärtsprimer 5'-accagagctcggggcctggatggccagcac-3',

CBR2/CBS4, Vorwärtsprimer 5'-ctctgttttgagccccccagacactctaca-3', Rückwärtsprimer 5'-gagtgtgtctggggggctcaaaacagagagg-3'. Um das Samd7-CBR1-Luciferase-Konstrukt zu klonieren, wurde mittels PCR eine 495bp Region der murinen Samd7-Promotorregion amplifiziert. Als Vorwärtsprimer diente dabei 5'-ttcgggggtaccgcccattctcacctagagca-3' und als Rückwärtsprimer 5'-ggtagcgctcgaggcccttgctgacagctctt-3'. Das Promotorfragment wurde vor die Luciferase in den pGL4.10 Reporter-Vektor mittels der Restriktionsenzyme *Kpn*I und *Xho*I subkloniert. Das RS1-Luciferase-Konstrukt wurde bereits beschrieben [27]. Design und Klonierung von p5xCrx-tk-Luc-Plasmid wurden ebenfalls kürzlich veröffentlicht [28].

2.3. Immunhistochemie

Für Antikörperfärbungen an Netzhautgewebe wurden Kryoschnitte mit 4% Paraformaldehyd fixiert und mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Schnitte in PBS rehydriert. Um unspezifische Proteinbindestellen zu blockieren, erfolgte eine Inkubation mit 1% Milchpulver in PBS sowie 0,01% Tween 20. Bei 4°C erfolgte anschließend über Nacht eine Inkubation mit dem primären anti-Samd7-Antikörper (Q-12, Sc100141, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) in PBS zusammen mit 2% BSA, 0,02% NaN₃ und 0,1% Triton X-100. Danach wurden die Schnitte für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem sekundären rot fluoreszierenden Antikörper (goat anti-rabbit conjugated to Alexa594, Dianova, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Die Kernfärbung erfolgte mit 0,1µg/ml DAPI in PBS (Molecular Probes, Life Technologies, Frankfurt, Deutschland) für zehn Minuten bei Raumtemperatur. Die Schnitte wurden in Fluorescent Mounting Medium (Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland) eingebettet und mit dem Zeiss Axio Imager Fluoreszenzmikroskop, ausgestattet

mit ApoTome.2 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland), ausgewertet. Die Analyse erfolgte mit der ZEN Software (Carl Zeiss, Jena, Deutschland).

2.4. Immunzytochemie

HEK293-Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert und für 48 Stunden mit dem Flag-Samd7-Plasmid transfiziert. Die Deckgläschen wurden mit 4% Paraformaldehyd fixiert und mit PBS gewaschen. Die Blockierung unspezifischer Proteinbindestellen erfolgte durch Inkubation mit einem Puffer, welcher 10% Ziegenerum und 0,3% Triton X-100 enthielt. Danach wurden die Zellen mit dem anti-Samd7-Antikörper (Q-12, Sc100141, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) bzw. dem anti-Flag-Antikörper (#2368, Cell Signaling technology, Cambridge, UK) inkubiert. Die Inkubation erfolgte mit 2,5% Ziegenerum und 0,1% Triton X-100 für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach weiterer 30-minütiger Inkubation mit dem sekundären rot fluoreszierenden Antikörper (Alexa594, Dianova, Hamburg, Deutschland) wurden die Deckgläschen mit PBS gewaschen und die Kerne mit DAPI gegengefärbt. Die Zellen wurden mit dem Zeiss Axio Imager Fluoreszenzmikroskop, ausgestattet mit ApoTome.2 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland), ausgewertet. Die Analyse erfolgte mit der ZEN Software (Carl Zeiss, Jena, Deutschland).

2.5. Western Blot Analyse

Netzhautgewebe der Maus wurde mittels TissueLyzer (Qiagen, Hilden, Deutschland) in gekühltem RIPA Puffer (50mM Tris/HCl pH 7,4, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,5% Natriumdeoxycholat, 0,1% SDS und Proteaseinhibitoren) homogenisiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch 5-minütige Zentrifugation bei 5000g entfernt. Mit Flag-Samd7- und Mock-Vektoren transfizierte HEK293-Zellen wurden in RIPA Puffer lysiert. Unter Verwendung des NE-PER nuclear protein extraction kit nach Gebrauchsanweisung des Herstellers (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland) konnten Kern- und Zytoplasmaextrakte gewonnen werden. Die Proteinkonzentrationen wurden durch den Bradford Assay (Roti-quant, Roth, Karlsruhe, Deutschland) ermittelt. Je 30µg Proteine und die PageRuler Protein-Leiter (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) wurden per SDS-PAGE (10%ige Gele) aufgetrennt. Im Anschluss wurden die Proteine auf 0,45µm dicke Nitrozellulose-Membranen transferiert (Biorad, München, Deutschland). Nach Blockierung

der unspezifischen Proteinbindestellen durch Inkubation in PBS mit 3,5% fettfreiem Milchpulver, wurden die Membranen mit dem primären anti-Samd7-Antikörper (Q-12, Sc100141, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), dem anti-Flag-Antikörper (#2368, Cell Signaling technology, Cambridge, UK) oder dem anti- β -Actin-Antikörper (mAbcam 8224, Cambridge, UK) inkubiert. Danach folgte die Inkubation des Blots mit dem sekundären Ziege anti-Hase IgG Antikörper, an den das Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt war. Die Western Blot Signale wurden mittels Multiimage II system (Alpha Innotech, Santa Clara, CA, USA) visualisiert.

2.6. In vitro Elektroporation und Kultur von Netzhautgewebe

In vitro Elektroporation von Netzhautgewebe wurde bereits durchgeführt und beschrieben [12]. In der vorliegenden Studie wurden nun Netzhäute von P0 Wildtyp CD1 Mäusen präpariert und in eine Elektroporationskammer gelegt. Die Kammer enthielt eine Mischung aus pCAG-GFP als Kontrolle und dem Reporter-Konstrukt, welches über dsRed-Expression sichtbar wurde. Die Retinas wurden fünf 30V-Impulsen ausgesetzt. Die Impulse dauerten 50ms und wurden im Abstand von 950ms ausgelöst. Dafür wurde ein ECM 830 Square-wave Elektroporator verwendet (BTX Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). Jedes Konstrukt wurde in drei verschiedene Retinas elektroporiert und es wurden drei verschiedene Elektroporationen durchgeführt. Die Netzhäute wurden dann in Medium geschwenkt und auf runde Nucleopore Filter (25mm, 0,2mm; VWR, Darmstadt, Deutschland) gelegt, die Linse jeweils in Richtung Membran gerichtet. Nach acht Tagen in vitro Kultur wurden die Netzhäute fixiert und als Flachpräparate sowie im Querschnitt dargestellt. Für die Quantifizierung der Promotoraktivität wurde - wie bereits beschrieben [29] - die dsRed-Fluoreszenz zur Fluoreszenz der GFP-Kontrolle normalisiert. Dabei wurde an Flachpräparaten der Retina mittels Fluoreszenz Mikroskop (Axioskop2 MOT Plus, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) die Intensität der roten und grünen Kanäle erfasst; es wurden fünf zu untersuchende Bereiche innerhalb und drei außerhalb der Retina mittels ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) definiert. Zur Normalisierung wurde dann die höchste Pixel-Intensität des roten Kanals (nach Abzug des Hintergrunds) durch die Pixel-Intensität des grünen Kontrollkanals geteilt.

2.7. Transiente Transfektion, Luciferase- und β -Gal-Assays

HEK293-Zellen wurden in DMEM Medium mit 10% FCS sowie 100U/ml Penicillin/Streptomycin in einem Feuchtinkubator bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre kultiviert. Die Zellen wurden in 12-Well Platten mit 0,2µg Reporter-Plasmid transfiziert. Dabei wurde unter Verwendung der Anweisungen des Herstellers das TransIT-LT1 Transfektionsreagenz (Mirus, Madison, WI, USA) verwendet. Für die Kotransfektionen wurde 0,2µg Luciferase-Plasmid zusammen mit verschiedenen Konzentrationen an pcDNA4/HisMax-Crx, pcDNA4/-Samd7, oder einem leeren Expressionsvektor verwendet. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden 0,4µg pSV β -galactosidase Vektor (Promega, Madison, WI, USA) in jeder Reaktion kotransfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit Lysepuffer (Promega, Madison, WI, USA) abgeschabt. Für die Luciferase-Assays wurden 20µl des Zytoplasmaextrakts mit 100µl des Luciferase-Assay-Reagenz vermischt. Die Lichtemission wurde mit dem FluoStar Optima reader (BMG LABTECH GmbH, Offenburg, Deutschland) gemessen. Alle Daten wurden mittels des Promega β -galactosidase Enzym-Assays (Promega, Madison, WI, USA) unter Berechnung der Absorbanz bei 420nm zur β -galactosidase Aktivität normalisiert. Dabei wurde die mehrfache Aktivität relativ zur Kontrolle berechnet. Für jedes Konstrukt wurden mindestens sechs unabhängige Experimente durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde mittels One-way Analysis of Variance sowie Tukey's Post Hoc Test ermittelt.

2.8. RNA-Isolation, RT-PCR und quantitative (real-time) RT-PCR

Total RNA wurde aus verschiedenen murinen Gewebearten und Netzhäuten an unterschiedlichen postnatalen Tagen mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Die Qualität der RNA wurde mittels Agilent 2100 Bioanalyzer sowie mittels RNA 6000 Nano LabChip reagent kit (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) ermittelt. Reverse Transkription wurde mittels RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis kit (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) durchgeführt. Mit 50ng cDNA und dem Vorwärtsprimer 5'-tcacttctactcaggctggggca-3' sowie dem Rückwärtsprimer 5'-gttctccgtgggggttgcg-3' wurde durch RT-PCR ein 563bp langes Produkt des murinen Samd7 aus Magen, Lunge, Leber, Hoden, Niere, Milz, Gehirn, Netzhaut, Herz, Muskel und Epiphyse amplifiziert. Ein 293bp langes Produkt von Samd11 wurde mittels dem Vorwärtsprimer 5'-tgccagcccagccaaccaag-3' und dem Rückwärtsprimer 5'-tgtggtctctcatcagtgaaga-3' aus

Epiphysen cDNA amplifiziert. Ein 292bp langes Fragment von β -Actin wurde als Referenz mittels Taq Core kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) unter Standard-PCR-Bedingungen in 25 Zyklen amplifiziert. Als Vorwärtsprimer diente dabei 5'-accacactgtgccatcta-3' und als Rückwärtsprimer 5'-cggaaccgctcattgcc-3'. qRT-PCR wurde mit dem TaqMan 7900HT PCR detection System (Invitrogen Life Technologies, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Das insgesamt 10 μ l umfassende Reaktionsgemisch enthielt 1x TaqMan Gene Expression Master Mix (Invitrogen Life Technologies, San Diego, CA, USA), 200nM Primer und 0,25 μ l dual-labeled probe (Roche Universal Probe Library, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland). Für die Detektion der murinen Samd7-Transkripte wurden Intron überspannende Primer (Vorwärtsprimer 5'-tgatggaaagaatggggtt-3', Rückwärtsprimer 5'-tctgagtgaacctgctcat-3') mit der Universal Probe # 34 kombiniert. Atp5b wurde als stabiles Referenzgen mit der Probe # 77 amplifiziert (Vorwärtsprimer 5'-ggcacaatgcaggaaagg-3', Rückwärtsprimer 5'-tcagcaggcacatagatagcc-3'). Für die PCR- Reaktion galten folgende Parameter: Auftrennung der DNA in Einzelstränge für 40 Sekunden bei 95°C, Annealing-Phase von einer Minute bei 60°C, Extensionsphase von zwei Minuten bei 72°C. Jeder Lauf bestand aus 40 Zyklen und jede Messung wurde in Triplikaten durchgeführt. Die Effizienz der PCR beider Produkte wurde mittels schrittweiser Verdünnung der murinen cDNA ermittelt und ergab über 90%. Die Ergebnisse wurden mit der ABI sequence detector Software version 2.3 und der $\Delta\Delta C_t$ Methode für Relative Quantification analysiert.

3. Ergebnisse

3.1. Klonierung von murinem Samd7

Erst kürzlich wurden die Zielsequenzen des retinalen Transkriptionsfaktors Crx mittels Chromatin-Immunoprecipitation und massiv-paralleler Sequenzierung analysiert (ChIP-seq) [12]. Diese Daten lenkten die Aufmerksamkeit auf Samd7, ein bisher nicht charakterisiertes Protein mit einer SAM-Domäne. Besonders auffallend war hierbei, dass der Genlocus Samd7 mit den meisten Crx-ChIP-seq-Reads assoziiert war, was auf eine hohe Expression und wichtige Funktion in der murinen Retina hindeutet. Um den 445 Aminosäuren langen offenen Leserahmen des murinen Samd7-Gens zu klonieren, wurde eine RT-PCR mit cDNA von zwei Monate alten murinen Retinas durchgeführt. Der offene Leserahmen von Samd7 enthält eine einzelne SAM-Domäne am C-terminalen Ende (Abb. 1 A), welche hohe Homologie mit den SAM-Domänen der bekannten Proteine Samd4, Epha4, Ephb2, Tel, Samd11, Phc2, Mph1 und Phc1 (Abb. 1 B) zeigt. Phylogenetische Analysen ergaben, dass Samd11 der nächste Verwandte von Samd7 ist. Beiden fehlen weitere bekannte Protein-Domänen (Abb. 1 C). Samd11 wurde kürzlich charakterisiert als das major retinal SAM domain protein (mr-s), welches vermutlich als transkriptionaler Repressor in Fotorezeptoren fungiert [25]. Der offene Leserahmen des murinen Samd7 ist hoch konserviert in Ratten, Menschen, Hühnern und Zebrafischen (Abb. 1 D). Samd7 wird auf dem murinen Chromosom 3A3 abgebildet. Das menschliche Ortholog befindet sich an Position 3q26.2, eine Position die bisher nicht als Locus für ein retinales Krankheitsgen identifiziert wurde.

B: Aminosäurenabgleich ausgewählter SAM-Domän-Sequenzen mittels Clustal W Blosum 62. Die Farbtöne zeigen das Übereinstimmungsniveau an (von schwarz: 100% bis hellgrau: weniger als 60%).

C: Phylogenetische Konservierung von Proteinen mit SAM-Domänen. Die Länge eines Astes gibt an, wie viele Substitutionen stattgefunden haben. Die Entfernungsskala zeigt die Anzahl der Unterschiede zwischen den Sequenzen (0,1 bedeutet 10% Unterschied zwischen zwei Sequenzen).

D: Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz der Samd7-Proteine von Maus (Mouse), Ratte (Rat), Mensch (Human), Huhn (Chicken) und Zebrafisch (Zebrafish). Die prozentuale Übereinstimmung wird sowohl für das gesamte Protein gezeigt als auch für einzelne Abschnitte.

3.2. Samd7-Expression in der murinen Retina und Epiphyse

Um die retinale mRNA-Expression von Samd7 mit der retinalen mRNA-Expression anderer SAM-Proteine, denen ebenfalls zusätzliche funktionelle Domänen fehlen, zu vergleichen, wurden kürzlich veröffentlichte DNA-Microarray Daten untersucht [30]. Es fanden sich sieben dieser SAM-Proteine in der Microarray-Analyse. Samd11 zeigte dabei höchstes Expressionsniveau in der Netzhaut an P7 (Abb. 2 A). Samd7 und Samd14 zeigten ebenfalls eine signifikante Expression, wohingegen Samd4, Samd5, Samd10 und Samd12 nur schwach exprimiert waren (Abb. 2 A). Um die Gewebespezifität der Samd7-Expression zu analysieren, wurde mittels RT-PCR das Samd7-Transkriptionslevel in diversen murinen Gewebearten untersucht. Es ergab sich, dass Samd7 in der Netzhaut stark exprimiert wurde, wohingegen sich keine Expression im Magen, Lunge, Leber, Hoden, Niere, Milz, Gehirn, Herz oder Muskel zeigte (Abb. 2 B). Weil viele fotorezeptorspezifische Gene, inklusive dem verwandten Samd11, eine Expression in der Epiphyse zeigen [25, 31], wurde als Nächstes die Samd7-Transkription in diesem Gewebe analysiert. RT-PCR bestätigte die bereits beschriebene schwache Expression von Samd11 [25] und zeigte eine ausgeprägte spezifische Bande für Samd7 (Abb. 2 C). Sodann wurde die Samd7-mRNA-Expression zu verschiedenen Zeitpunkten der späten retinalen Entwicklung mittels qRT-PCR untersucht. Schwache Expression zeigte sich dabei am Tag der Geburt sowie an den Tagen P1 bis P3 (Abb. 2 D). Die Expression zeigte einen Peak bei P5, um sich an den darauffolgenden Tagen auf mittlerem Niveau einzupendeln (Abb. 2 D). Da das frühe Expressionsmuster von Samd7 dem Reifungsprozess der Fotorezeptoren ähnelt, kann vermutet werden, dass dem Protein vor allem in ausgereiften Fotorezeptoren seine Funktion zukommt.

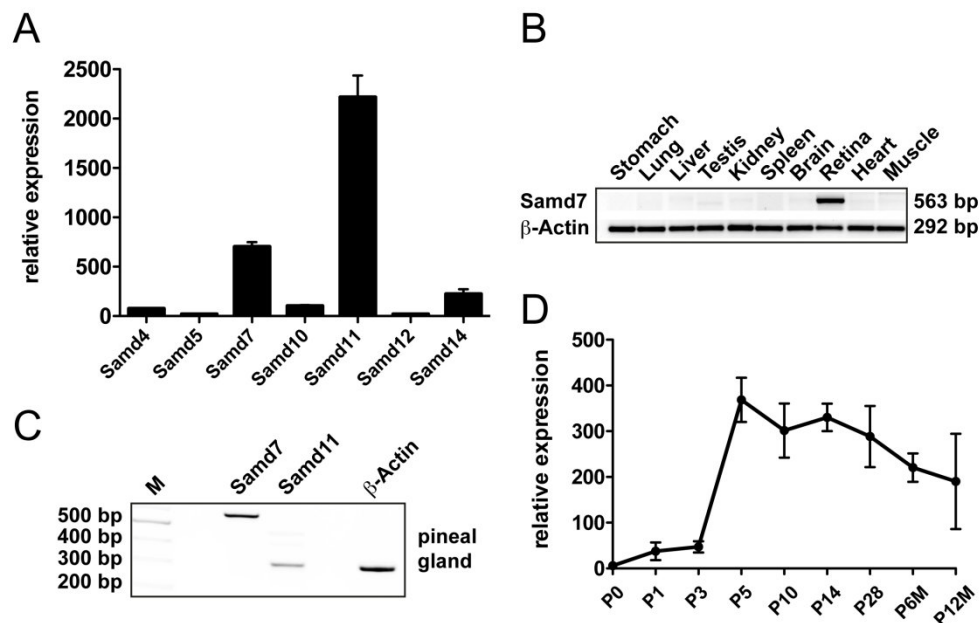


Abbildung 2: Samd7 wird in der murinen Netzhaut und Epiphyse (pineal gland) exprimiert.

A: Relative mRNA-Expression (relative expression) von Proteinen mit isolierter SAM-Domäne an P7 in der murinen Netzhaut. Affymetrix mouse expression 430A arrays (GEO accession number GSE5581) zeigen, dass Samd7 diesbezüglich das zweithäufigste Transkript in der Netzhaut ist.

B: RT-PCR Analyse von total RNA aus Magen (Stomach), Lunge (Lung), Leber (Liver), Hoden (Testis), Niere (Kidney), Milz (Spleen), Gehirn (Brain), Netzhaut (Retina), Herz (Heart) und Muskel (Muscle) der Maus, welche die netzhautspezifische mRNA-Expression von Samd7 zeigt. Ladekontrolle: β -Actin.

C: RT-PCR Analyse von total RNA der murinen Epiphyse. Für die PCR wurden spezifische Primerpaare für Samd7, Samd11 und β -Actin verwendet.

D: Real-time qRT-PCR Analyse früher postnataler und ausgereifter Retinas zeigt einen Expressionspeak von Samd7 an P5 und bleibt dann auf mittlerem Niveau.

3.3. Samd7-Lokalisation in der äußeren Körnerschicht sowie im Zytoplasma und im Kern transfizierter Zellen

Mit dem Wissen einer hohen mRNA-Expression in der Retina, war das nächste Ziel, die Lokalisation des Samd7-Proteins in der murinen Netzhaut zu ermitteln. Zunächst wurde hierzu eine Immunhistochemie an Netzhautschnitten erwachsener Mäuse mit einem handelsüblichen anti-Samd7-Antikörper durchgeführt. Diese Experimente zeigten, dass Samd7 vor allem in der äußeren Körnerschicht lokalisiert ist, in welcher Stäbchen und Zapfen vorkommen (Abb. 3 A). Im Anschluss wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt, um die Spezifität des Antikörpers zu zeigen. Das 49kDa schwere Samd7-Protein wurde als spezifische Bande in den Netzhautextrakten erwachsener Mäuse sichtbar gemacht (Abb. 3 B). Um die Spezifität des Antikörpers weiter zu bestätigen, wurde ein Samd7-Protein mit einem Flag-Tag in HEK293-Zellen kloniert und exprimiert. Nun wurde mit beiden, dem anti-Flag-Antikörper und dem anti-Samd7-Antikörper, eine spezifische Bande bei 51kDa detektiert

(Abb. 3 C). Dieses Ergebnis bestätigte, dass der anti-Samd7-Antikörper spezifisch an Samd7 bindet.

Um mehr über die subzelluläre Lokalisation von Samd7 in der Säugetierzelle zu erfahren, wurden erneut HEK293-Zellen analysiert, welche mit Flag-tagged Samd7 transfiziert wurden. Zelllysate wurden gewonnen und mit Zytoplasmaextrakten und Kernextrakten Western Blots durchgeführt. Nach Anwendung des anti-Flag-Antikörpers und des anti-Samd7-Antikörpers konnten sowohl im Zytoplasma als auch im Kern Samd7-Banden identifiziert werden. Stärkere Signale zeigten sich in den Kernfraktionen, welche sich oft als Doppelbanden mit etwas unterschiedlichem Molekulargewicht und einer durchschnittlichen Größe von 51kDa darstellten (Abb. 3 D). Als Nächstes wurden Mock- und Flag-Samd7-transfizierte Zellen mittels Immunzytochemie unter der Anwendung von anti-Flag- und anti-Samd7-Antikörpern analysiert (Abb. 3 E-P). Die immungefärbten Zellen, welche mit DAPI gegengefärbt wurden, zeigten in der Fluoreszenzmikroskopie eine Hauptlokalisierung von Samd7 im Kern (Abb. 3 H-J, N-P). Diese Daten deuten darauf hin, dass ein signifikanter Teil des Samd7-Proteins im Kern lokalisiert ist. Interessanterweise zeigt sein engster Verwandter Samd11 ebenfalls ein starkes Vorhandensein im Kern, wenn es in HEK293-Zellen transfiziert wird [25].

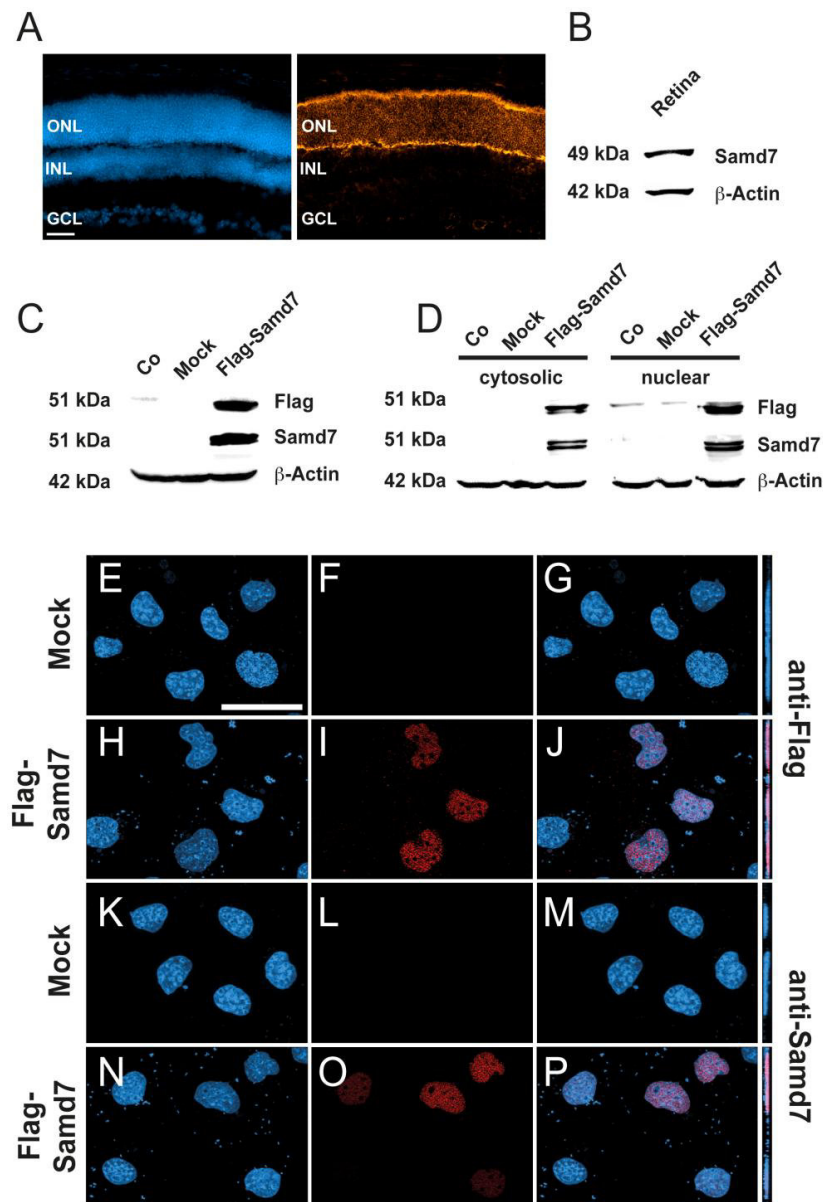


Abbildung 3: Samd7 wird in der äußeren Körnerschicht exprimiert und ist im Kern transfizierter Zellen lokalisiert.

A: Mittels Immunhistochemie wird gezeigt, dass Samd7 in der äußeren Körnerschicht der erwachsenen murinen Retina lokalisiert ist. Linkes Bild: DAPI-Färbung. Rechtes Bild: Färbung mit anti-Samd7-Antikörper. ONL: outer nuclear layer (äußere Körnerschicht), INL: inner nuclear layer (innere Körnerschicht), GCL: ganglion cell layer (Ganglienzellschicht). Maßstab: 50µm.

B: Western Blot mit Netzhautlysaten erfasst Samd7 bei einem Molekulargewicht von 49kDa. Ladekontrolle: β-Actin.

C: Western Blot mit Proteinlysaten naiver HEK293-Zellen (Co) oder transfizierter HEK293-Zellen mit Mock-Plasmid bzw. Flag-Samd7-Expressionsplasmid. Folgende Antikörper wurden verwendet: anti-Samd7-Antikörper, anti-Flag-Antikörper und anti-β-Actin-Antikörper. Die Flag-Samd7-Bande hatte ein Molekulargewicht von ca. 51kDa.

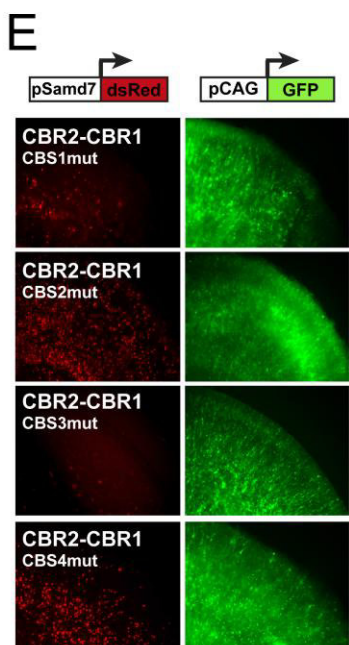
D: Western Blot mit Zytoplasma- und Kernlysaten transfizierter HEK293-Zellen mit Mock-Plasmid oder Flag-Samd7-Expressionsvektor. Samd7 lässt sich sowohl im Zytoplasma als auch im Kern bei einem Molekulargewicht von 51kDa nachweisen.

E-P: Zelluläre Lokalisation von Samd7 in HEK293-Zellen, welche mit Flag-Samd7 transfiziert wurden. Die Expression wird in Fluoreszenzbildern mit Z-Stapel gezeigt. Mock-transfizierte Zellen zeigen weder mit dem anti-Flag-Antikörper (F) noch mit dem anti-Samd7-Antikörper (L) ein spezifisch rotes Signal. Sowohl der anti-Flag-Antikörper (I, J) als auch der anti-Samd7-Antikörper (O, P) zeigen eine spezifische Kernfärbung in Flag-Samd7-transfizierten Zellen bei einer Kofärbung mit DAPI.

3.4. Kontrolle der Samd7-Transkription durch Crx

Die Identifikation von Samd7 als in vivo Ziel von Crx in der Crx-ChIP-seq-Studie [12] und seine netzhautspezifische Expression legen nahe, dass die Transkription von Samd7 direkt durch Crx reguliert wird. Durch Untersuchung der Lokalisation der retinalen Crx-ChIP-seq-Reads am Samd7-Locus wurden zwei Crx-bindende Regionen (CBRs) entdeckt, eine in der Promotorregion und eine im ersten Intron (Abb. 4 A). Die Sequenzanalyse der kürzlich veröffentlichten RNA Polymerase II-ChIP-chip-Daten [32] zeigte auch eine signifikante Pol II Assoziation mit der Promotorregion von Samd7 an P2 (Abb. 4 A). An P25, wenn die Netzhaut ausgereift ist, sind Pol II Peaks in der Promotorregion und im ersten Intron zu sehen. Diese Pol II bindenden Regionen überlappen vollständig mit den Crx-bindenden Regionen (Abb. 4 A). Dies zeigt, dass diese regulatorischen Einheiten tatsächlich als Start- und Verlängerungspunkte der Samd7-Transkription in der erwachsenen Retina fungieren. Eine bioinformatische Sequenzanalyse mit MatInspector ergab, dass CBR1 drei kanonisch Crx-bindende Sequenzen enthält (CBS 1-3), wohingegen CBR2 vier CBS enthält (Abb. 4 A). Eine annähernd perfekte phylogenetische Konservierung der Crx-Bindestellen wurde in CBS1 und CBS3 innerhalb CBR2 gefunden (Abb. 4 B). Um zu testen, ob CBR1 und CBR2 aktive cis-regulatorische Einheiten repräsentieren, wurden CBR-dsRed-Reporter-Konstrukte in murine Netzhäute elektroporiert. CBR1, welche in der proximalen Promotorregion des Samd7-Gens lokalisiert ist, zeigte keine erkennbare dsRed-Expression in der Netzhaut (Abb. 4 C). Im Gegensatz dazu führte das im Intron gelegene CBR2 - einem minimal Rhodopsin Promotor, welcher alleine keine Aktivität zeigt, vorgeschaltet - zu einer starken Expression. Das Fluoreszenzsignal erschien dabei in der äußeren Körnerschicht, also der Schicht, in der die Fotorezeptoren lokalisiert sind (Abb. 4 C). Um den Beitrag einzelner Crx-Bindestellen zur starken Aktivität von CBR2 beurteilen zu können, wurde zielgerichtete Mutagenese an den entscheidenden Crx-Bindestellen durchgeführt. Gleichzeitige Mutationen in allen vier CBS von CBR2 führten zu einem kompletten Aktivitätsverlust in den elektroporierten Netzhautexplantaten (Abb. 4 C). Dann wurden Elektroporationen und Fluoreszenzmessungen mit Konstrukten durchgeführt, in denen nur eine der vier CBS eliminiert war. Während eine Mutation in CBS1 und CBS3 zum Verlust der Enhancer-Aktivität führte, hatte eine Mutation in CBS2 und CBS4 keinen größeren Effekt (Abb. 4 D). Um zu analysieren, ob dieselben Stellen der im Intron gelegenen CBR2 auch die Aktivität des eigenen Promotors verstärken, wurden mutierte CBR2 Fragmente vor CBR1 kloniert und die Reporter-Aktivität gemessen. In Übereinstimmung zu den Daten der CBR2 Elektroporationen reduzierte eine Mutagenese in CBS1 und CBS3 die dsRed-Expression, wohingegen eine Mutation in CBS2 und CBS4

Abbildung 4: Die Samd7-Transkription wird durch Crx reguliert.
A: Identifikation zweier Crx-bindender Regionen (CBR1 und CBR2) am murinen Samd7-Locus. Viele Crx-ChIP-seq-Regionen befinden sich im proximalen Promotor und im ersten Intron von Samd7 [12]. RNA Polymerase II-ChIP-Chip-Peaks überlappen an P2 und P25 [32] mit den Crx-ChIP-Seq-Regionen. Der Grad der Konservierung in Säugetieren (Mamm Cons) wird gezeigt. Die Nukleotidsequenzen der kanonischen



A: Identifikation zweier Crx-binder Regionen (CBR1 und CBR2) am murinen Samd7-Locus. Viele Crx-ChIP-seq-Regionen befinden sich im proximalen Promotor und im ersten Intron von Samd7 [12]. RNA Polymerase II-ChIP-Chip-Peaks überlappen an P2 und P25 [32] mit den Crx-ChIP-Seq-Regionen. Der Grad der Konservierung in Säugetieren (Mamm Cons) wird gezeigt. Die Nukleotidsequenzen der kanonischen

Crx-bindenden Sequenzen (CBS) innerhalb CBR1 und CBR2 sind dargestellt.

B: Die phylogenetische Konservierung von CBS1 und CBS3 innerhalb CBR2 wird für einige Spezies dargestellt: Maus (Mouse), Ratte (Rat), Mensch (Human), Schimpanse (Chimp), Rhesusaffe (Rhesus), Hund (Dog), Pferd (Horse), Huhn (Chicken).

C-E: Aktivität von Samd7-Wildtyp-CBRs und mutierten CBRs in explantierten murinen Retinas.

Koelektroporationen mit pCAG-eGFP als Kontrolle und mit den dargestellten Samd7-regulatorischen Elementen, fusioniert mit dsRed, wurden durchgeführt. Alle Konstrukte wurden an P0 elektroporiert und die kultivierten Explantate wurden an P8 geerntet.

C: CBR1 ist nicht aktiv, wenn es an einen dsRed-Reporter ohne Promotor gebunden ist. Im Gegensatz dazu führt CBR2 zu einer starken dsRed-Expression, wenn es an den minimal Rhodopsin Promotor gekoppelt ist, welcher für sich alleine nicht aktiv ist. Die Querschnitte (cross-sections) zeigen, dass die dsRed-Signale, ausgelöst durch Samd7-CBR2, in der äußeren Körnerschicht lokalisiert sind, wohingegen die GFP-Signale des Kontrollpromotors in der ONL, INL und GCL lokalisiert sind. ONL: outer nuclear layer (äußere Körnerschicht), INL: inner nuclear layer (innere Körnerschicht), GCL: ganglion cell layer (Ganglienzellschicht).

D: Eine quantitative Analyse mutierter Konstrukte zeigt, dass CBS1 und CBS3 für eine hohe Reporter-Expression von CBR2 unerlässlich sind.

E: Die Enhancer-Aktivität von CBR2, CBR1 vorgeschaltet, braucht ebenso intakte Nukleotidsequenzen in CBS1 und CBS3.

Um herauszufinden, ob Crx für die Samd7-Genaktivität notwendig ist, wurden Crx-knock-down-Experimente in murinen Retinas durchgeführt. Dazu wurden Elektroporationen mit Crx shRNA Plasmiden oder scramble shRNA negativen Kontrollen zusammen mit dem Samd7-CBR2-Reporter-Konstrukt durchgeführt. Diese Experimente führten zu einem kompletten Verlust der dsRed-Fluoreszenz in Crx-knock-down-Retinas im Vergleich zu denen mit scramble shRNA (Abb. 5 A). Das heißt, dass die Crx-bindenden Sequenzen in CBR2 auf das Vorhandensein von Crx angewiesen sind. Als Nächstes wurde die endogene Samd7-Expression in demselben Crx-knock-down-Konstrukt mittels Immunhistochemie erforscht. Eine mit der scramble shRNA Kontrolle koelektroporierte Netzhaut zeigte an P8 das Samd7-Protein an der Grenze zwischen innerer und äußerer Körnerschicht exprimiert (Abb. 5 B). Diese spezifische Färbung der Samd7-Signale verschwand fast vollständig in Crx-knock-down-Retinas (Abb. 5 B). Dies legt nahe, dass die endogene Expression von Samd7 das Vorhandensein von Crx erfordert.

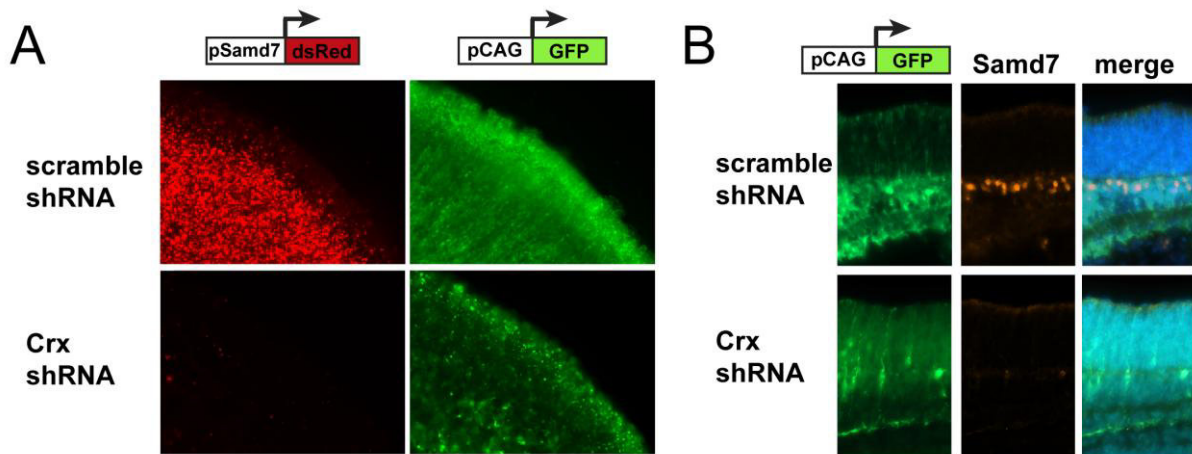


Abbildung 5: Samd7-Expression ist in Crx-knock-down-Mäusen reduziert.

A: Die Aktivität von Wildtyp-Samd7-CBR2 verbunden mit dsRed ist stark reduziert in explantierten murinen P8 Netzhäuten, welche mit Crx shRNA koelektroporiert wurden.

B: Reduzierte Färbung des endogenen Samd7 mit anti-Samd7-Antikörper in murinen P8 Retinas, welche mit Crx shRNA elektroporiert wurden, verglichen mit einer scramble shRNA Kontrolle. pCAG-eGFP wurde als Elektroporationskontrolle verwendet und ein scramble shRNA Vektor fungierte als Negativkontrolle für knock-down-Experimente. DAPI Färbung wurde in den übereinandergelegten (merge) Bildern verwendet.

3.5. Samd7 als Transkriptionsrepressor

Die gewonnenen Ergebnisse, nämlich dass Samd7 in der äußeren Körnerschicht der ausgereiften murinen Netzhaut sowie im Kern transfizierter Zellen lokalisiert ist, führten zu weiteren Überlegungen. Es schien naheliegend, dass das Protein an der Regulation der Transkription beteiligt sein könnte. In Ermangelung einer offensichtlichen DNA-Bindestelle ließ sich vermuten, dass Samd7 die Aktivität von retinalen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. Crx, beeinflussen könnte. Um diese Hypothese zu verifizieren, wurde mittels Luciferase-Assays der Effekt einer Samd7-Kotransfektion auf die Crx-abhängige Promotoraktivität untersucht. In den ersten Experimenten wurde ein kürzlich veröffentlichter Crx-abhängiger Luciferase-Reporter, welcher fünf Repeats übereinstimmender Crx-Bindestellen unter der Kontrolle eines minimal Thymidinkinase Promotors enthielt, genutzt [28]. Wie erwartet zeigte dieses Konstrukt einen fünffachen Anstieg bei Kotransfektion mit Crx (Abb. 6 A). Samd7 führte zu einem signifikanten dosisabhängigen suppressiven Effekt auf dieses Crx-Reporter- Konstrukt (Abb. 6 B). Die effektivste Konzentration dieser Titrationsexperimente wurde selektiert und sodann wurden spezifische regulatorische Sequenzen analysiert. Die Netzhautexpression des murinen und humanen Retinoschisin-Gens (RS1) ist durch Crx reguliert und ist damit ein echtes Crx-Zielgen [27]. Deshalb wurde dieser Promotor für Crx-spezifische Transaktivations-Assays (mit und ohne Samd7-Expressionsplasmid) ausgewählt

(Abb. 6 C). Es konnte gezeigt werden, dass die Kotransfektion mit Crx zu einem starken Anstieg der Luciferase-Aktivität eines RS1-Reporter-Konstrukts in HEK293-Zellen führt (Abb. 6 C). Der Anstieg des Luciferase-Levels durch Crx wurde durch Samd7 signifikant reduziert (Abb. 6 C). Da Samd7 selbst durch Crx reguliert wird, wurden als Nächstes die Effekte einer Samd7-Kotransfektion auf sein eigenes Promotorkonstrukt beleuchtet. Wie erwartet, führte eine Crx-Transfektion zu einer deutlich ansteigenden Luciferase-Aktivität des proximalen Samd7-Promotors (Abb. 6 D). Analog zum Retinoschisin-Gen verringerte eine Samd7-Kotransfektion die Reporter-Aktivität des Samd7-Gens selbst (Abb. 6 D). Diese Experimente legen nahe, dass Samd7 als negativer Regulator der Crx-kontrollierten fotorezeptorspezifischen Genexpression fungiert.

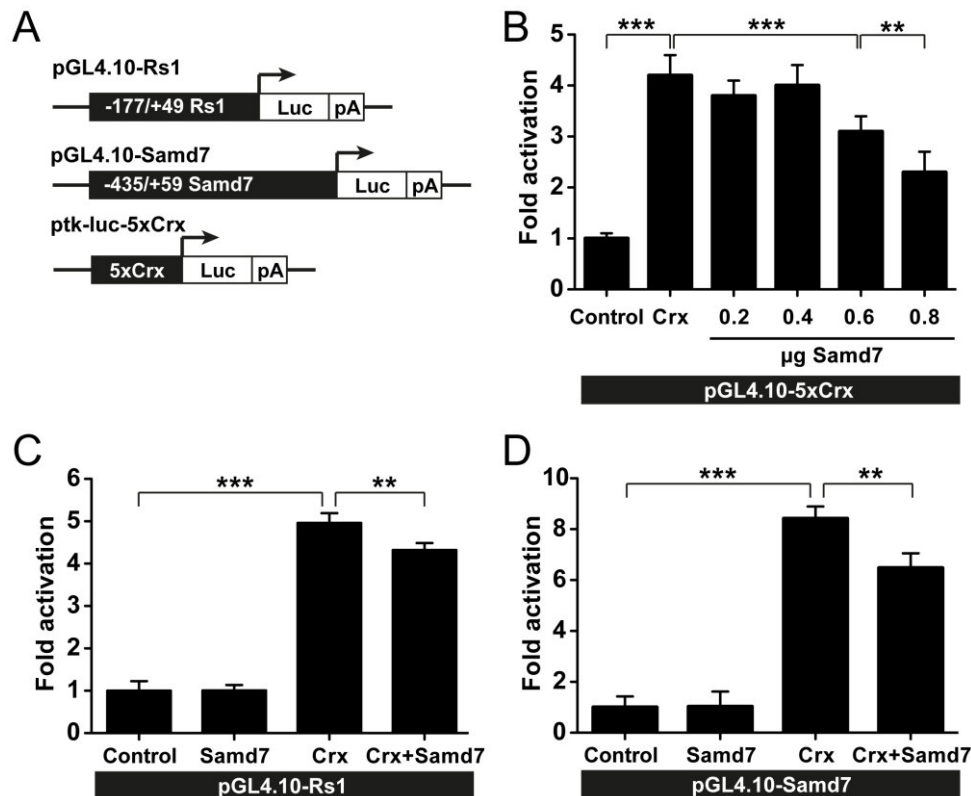


Abbildung 6: Samd7-abhängige Suppression Crx-aktivierter Promotoren.

A: Schematische Zeichnung von Retinoschisin-, Samd7- und 5xCrx-tk-Luc-Reportern, welche für die Luciferase-Assays in HEK293-Zellen verwendet wurden.

B: Das 5xCrx-tk-Luc-Konstrukt wurde mit Crx und verschiedenen Konzentrationen der Samd7-Expressionsplasmide kotransfiziert.

C: Das Samd7-Expressionsplasmid wurde in An- oder Abwesenheit des Crx-Vektors kotransfiziert und die Retinoschisin-Promotoraktivität gemessen.

D: Das Samd7-Expressionsplasmid wurde in An- oder Abwesenheit des Crx-Vektors kotransfiziert und die Samd7-Promotoraktivität gemessen.

Ein pSV β -galactosidase Vektor wurde zur Kontrolle der Transfektionseffizienz in jeder Reaktion kotransfiziert. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen der Mittelwerte (n=6). ** $P < 0,01$ und *** $P < 0,001$ One-way Analysis of Variance sowie Tukey's Post Hoc Test.

4. Diskussion

4.1. Samd7, das neu charakterisierte Protein mit einer SAM-Domäne

Im Rahmen dieser Studie erfolgte die Klonierung und Charakterisierung von Samd7, einem neu identifizierten Protein mit einer SAM-Domäne. Es zeigte sich, dass Samd7 sowohl in der Retina als auch in der Epiphyse exprimiert wird. Sein Expressionspeak ist an P5, der Zeitpunkt, an dem sich Fotorezeptoren in ihre funktionelle Form differenzieren. Die Immunhistochemie retinaler Mausschnitte ergab, dass das Samd7-Protein hauptsächlich in der äußeren Körnerschicht lokalisiert ist. Ektope Expression von Samd7 in Zellkulturen zeigte ein Vorkommen im Zytoplasma sowie im Kern. Die retinale Expression und cis-regulatorische Aktivität des Samd7-Locus wird entscheidend von einer phylogenetisch konservierten Crx-bindenden Enhancer-Region im ersten Intron kontrolliert. Dies ergaben Elektroporationen der Netzhaut und knock-down-Experimente. Die mögliche Funktion von Samd7 wurde weiterhin mit Luciferase-Assays evaluiert. Diese Experimente zeigten, dass Samd7 die künstlichen Crx-regulatorischen Einheiten und die spezifischen Promotoraktivitäten der Crx-Zielgene hemmt. Dadurch ergibt sich eine mögliche Funktion als neuer Transkriptionsregulator in der Netzhaut.

4.2. Samd7 und sein phylogenetisch engster Verwandter Samd11

Ein wichtiges Ergebnis der mRNA-Expressionsdaten ist, dass Samd7 das zweite identifizierte Protein mit einer SAM-Domäne ist, welches in der Netzhaut und in der Epiphyse stark exprimiert wird. Das kürzlich beschriebene Samd11-Protein ist der phylogenetisch engste Verwandte von Samd7 mit einem sehr ähnlichen Expressionsprofil [25]. Samd11-Moleküle können mit sich selbst interagieren und teilen mit Samd7 ein relativ ähnlich aufgebautes Protein sowie die Struktur der SAM-Domäne [25]. Im Moment ist es nicht möglich, über einfache rechnerische Ansätze uncharakterisierten SAM-Domänen Interaktionen oder Funktionen zuzuschreiben [33]. Während beide, Samd7 und Samd11, isolierte SAM-Domänen an ihrem C-terminalen Ende besitzen, fehlt jedem von ihnen ein weiteres bekanntes Motiv. Alle anderen Familienmitglieder mit isolierten SAM-Domänen, wie Samd1, Samd4, Samd5, Samd10, Samd12 und Samd14 sind nur sehr schwach in der Netzhaut exprimiert und es ist folglich unwahrscheinlich, dass diese mit Samd7 oder Samd11 interagieren. Interessant

wird deshalb zu untersuchen, ob und inwieweit die netzhautspezifischen Proteine Samd7 und Samd11 miteinander interagieren.

4.3. Samd7, ein Crx-Zielgen

Die Crx-abhängige Regulation von Samd7 in der murinen Netzhaut spielte eine Rolle in der kürzlich veröffentlichten ChIP-seq-Studie, welche zwei signifikante Crx-Peaks um den Samd7-Locus zeigen konnte [12]. Nun konnten die beiden relevanten cis-regulatorischen Einheiten in der Promotorregion und im ersten Intron des Gens mittels in vitro Elektroporation von Reporter-Konstrukten in murine Retinas genau bestimmt werden. CBR1, mit seinen drei Crx-Bindestellen, war alleine nicht aktiv und benötigte die Interaktion mit den Enhancer-Elementen von CBR2 im Intron, um eine dsRed-Reporter-Expression zu erzeugen. Mutagenese einzelner Crx-Motive in CBR2 zeigte zwei kritische Bindestellen, CBS1 und CBS3, welche in verschiedenen Spezies nahezu perfekt konserviert sind. Die GATTA Kernsequenz von CBS1 und CBS3 repräsentiert dabei eine perfekte Matrix, wie aus bioinformatischer Vorhersage und Sequenzanalyse von mehr als 5000 Crx-ChIP-seq-Regionen hervorgeht [10,12]. Des Weiteren zeigten die kürzlich veröffentlichten Pol II-ChIP-chip-Daten, dass RNA Polymerase II-Komplexe an die Promotorregion und das erste Intron von Samd7 binden und folglich die Transkription in der adulten Retina anstoßen [32]. Diese Ergebnisse definierten Samd7 als echtes Crx-Zielgen und bekräftigten die Annahme, dass viele Fotorezeptorgene von einem räumlich verteilten Netzwerk aus CBRs umgeben sind [34]. Crx reguliert Fotorezeptorgene oft zusammen mit Nrl [35]. Jedoch zeigte die Betrachtung der veröffentlichten Daten von Nrl-knock-out-Retinas keine abnormale Samd7-Expression [36]. Im Gegensatz dazu zeigte das Expressionsprofil einer Otx2-defizienten Retina eine signifikante Down-regulation von Samd7 an P12 [37]. Ungeklärt ist bisher, ob Samd7 tatsächlich ein Otx2-Zielgen ist oder ob der Verlust der Samd7-Expression vielleicht indirekt durch eine reduzierte Crx-Expression in Otx2-knock-out-Retinas verursacht wird.

4.4. Samd7, ein Transkriptionsregulator ohne DNA-Binderegion

Die Expression in der Retina, die Kernlokalisation und das Vorhandensein einer Domäne, die auch Samd11 besitzt, deuten darauf hin, dass auch Samd7 eine Rolle in der Transkriptionsregulation spielt. Tatsächlich zeigten in vitro Assays, dass Samd7 die Crx-

vermittelte Genexpression an künstlich hergestellten Crx-Bindestellen und an zwei verschiedenen netzhautspezifischen Promotoren beeinflusst. Beachtenswerterweise übte Samd7 diesen Effekt ohne offensichtliche DNA-Binderegion aus. Das Drosophila SAM-Protein Mae besitzt auch nur eine SAM-Domäne und hat keine DNA-Bindeaktivität [38]. Mae interagiert mit und ermöglicht die Phosphorylierung des Transkriptionsrepressors Yan über direkte Interaktion mit seiner SAM-Domäne [39]. Die Phosphorylierung von Yan führt zu einer Aufhebung seiner Repressorfunktion und zu einer Translokation ins Zytoplasma [39]. Deswegen ist es auch möglich, dass Samd7 seine Repressorfunktion ausübt, indem es Crx in nicht-aktive Proteinkomplexe überführt. In vitro Interaktionsstudien, wie z.B. pull-down-Assays, könnten diese Frage klären. Eine andere Möglichkeit ist, dass Samd7 Teil sogenannter Silencing Complexes ist, welche chromatinverändernde Enzyme, wie z.B. Histon Deacetylasen (HDACs), enthalten. Reporter-Assays in An- oder Abwesenheit von HDAC Inhibitoren, wie z.B. Trichostatin A, könnten helfen, diesen Repressionsmechanismus aufzuklären. Samd7 könnte auch wie der SAM-Domäne enthaltende polycomb-Komplex PRC2, welcher als Methyltransferase fungiert und Chromatin Loops in seinen Zielgenen organisiert, unabhängig von HDACs agieren [40].

4.5. Samd7 und seine Rolle in der retinalen Genexpression als Ziel zukünftiger Studien

Obwohl sich gezeigt hat, dass Samd7 die Transkription Crx-abhängiger Promotoren unterdrücken kann, sind die tatsächlichen Zielstrukturen von Samd7 bisher unbekannt. Es ist offensichtlich, dass an der Feinsteuerung der retinalen Genexpression aktivierende Transkriptionsfaktoren, wie Crx, involviert sind. Jedoch ist die Rolle der Transkriptionsrepressoren, welche durch ein Crx-dominiertes genregulatorisches Netzwerk kontrolliert werden, bisher kaum entschlüsselt. Kürzlich wurde Panky, ein fotorezeptorspezifisches Ankyrin Repeat Protein als ein anderer Kofaktor der Transkription identifiziert, welcher Crx-regulierte Fotorezeptorgene unterdrückt [28]. Es liegt die Vermutung nahe, dass Samd7 eine ähnliche Funktion haben könnte. Jedoch braucht es weitere Untersuchungen, um die Rolle von Samd7 in der retinalen Genexpression zu klären. Um diese Frage zu beantworten, wird es insbesondere hilfreich sein, Mäuse mit gezielten Defekten zu untersuchen oder knock-down-Experimente mittels in vivo Elektroporation von murinen Netzhäuten durchzuführen.

5. Literaturverzeichnis

1. Rattner A, Sun H, Nathans J (1999) Molecular genetics of human retinal disease. *Annu Rev Genet* 33: 89-131.
2. Blackshaw S, Fraioli RE, Furukawa T, Cepko CL (2001) Comprehensive analysis of photoreceptor gene expression and the identification of candidate retinal disease genes. *Cell* 107: 579-589.
3. Nishida A, Furukawa A, Koike C, Tano Y, Aizawa S, et al. (2003) Otx2 homeobox gene controls retinal photoreceptor cell fate and pineal gland development. *Nat Neurosci* 6: 1255-1263.
4. Chen S, Wang QL, Nie Z, Sun H, Lennon G, et al. (1997) Crx, a novel Otx-like paired-homeodomain protein, binds to and transactivates photoreceptor cell-specific genes. *Neuron* 19: 1017-1030.
5. Furukawa T, Morrow EM, Cepko CL (1997) Crx, a novel otx-like homeobox gene, shows photoreceptor-specific expression and regulates photoreceptor differentiation. *Cell* 91: 531-541.
6. Mears AJ, Kondo M, Swain PK, Takada Y, Bush RA, et al. (2001) Nrl is required for rod photoreceptor development. *Nat Genet* 29: 447-452.
7. Milam AH, Rose L, Cideciyan AV, Barakat MR, Tang WX, et al. (2002) The nuclear receptor NR2E3 plays a role in human retinal photoreceptor differentiation and degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 473-478.
8. Ng L, Hurley JB, Dierks B, Srinivas M, Salto C, et al. (2001) A thyroid hormone receptor that is required for the development of green cone photoreceptors. *Nat Genet* 27: 94-98.
9. Jia L, Oh EC, Ng L, Srinivas M, Brooks M, et al. (2009) Retinoid-related orphan nuclear receptor RORbeta is an early-acting factor in rod photoreceptor development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 17534-17539.
10. Hsiao TH, Diaconu C, Myers CA, Lee J, Cepko CL, et al. (2007) The cis-regulatory logic of the mammalian photoreceptor transcriptional network. *PLoS One* 2: e643.
11. Hobert O (2011) Regulation of terminal differentiation programs in the nervous system. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27: 681-696.
12. Corbo JC, Lawrence KA, Karlstetter M, Myers CA, Abdelaziz M, et al. (2010) CRX ChIP-seq reveals the cis-regulatory architecture of mouse photoreceptors. *Genome Res* 20: 1512-1525.
13. Langmann T, Di Gioia SA, Rau I, Stohr H, Maksimovic NS, et al. (2010) Nonsense mutations in FAM161A cause RP28-associated recessive retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet* 87: 376-381.

14. Ozgul RK, Siemiatkowska AM, Yucel D, Myers CA, Collin RW, et al. (2011) Exome sequencing and cis-regulatory mapping identify mutations in MAK, a gene encoding a regulator of ciliary length, as a cause of retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet* 89: 253-264.
15. Qiao F, Bowie JU (2005) The many faces of SAM. *Sci STKE* 2005: re7.
16. Robinson AK, Leal BZ, Chadwell LV, Wang R, Ilango U, et al. (2012) The Growth-Suppressive Function of the Polycomb Group Protein Polyhomeotic Is Mediated by Polymerization of Its Sterile Alpha Motif (SAM) Domain. *J Biol Chem* 287: 8702-8713.
17. Tu H, Barr M, Dong DL, Wigler M (1997) Multiple regulatory domains on the Byr2 protein kinase. *Mol Cell Biol* 17: 5876-5887.
18. Harada BT, Knight MJ, Imai S, Qiao F, Ramachander R, et al. (2008) Regulation of enzyme localization by polymerization: polymer formation by the SAM domain of diacylglycerol kinase delta1. *Structure* 16: 380-387.
19. Baron MK, Boeckers TM, Vaida B, Faham S, Gingery M, et al. (2006) An architectural framework that may lie at the core of the postsynaptic density. *Science* 311: 531-535.
20. Aviv T, Lin Z, Lau S, Rendl LM, Sicheri F, et al. (2003) The RNA-binding SAM domain of Smaug defines a new family of post-transcriptional regulators. *Nat Struct Biol* 10: 614-621.
21. Green JB, Gardner CD, Wharton RP, Aggarwal AK (2003) RNA recognition via the SAM domain of Smaug. *Mol Cell* 11: 1537-1548.
22. Slupsky CM, Gentile LN, Donaldson LW, Mackereth CD, Seidel JJ, et al. (1998) Structure of the Ets-1 pointed domain and mitogen-activated protein kinase phosphorylation site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 12129-12134.
23. Jousset C, Carron C, Boureux A, Quang CT, Oury C, et al. (1997) A domain of TEL conserved in a subset of ETS proteins defines a specific oligomerization interface essential to the mitogenic properties of the TEL-PDGFR beta oncoprotein. *Embo J* 16: 69-82.
24. Lai ZC, Rubin GM (1992) Negative control of photoreceptor development in *Drosophila* by the product of the *yan* gene, an ETS domain protein. *Cell* 70: 609-620.
25. Inoue T, Terada K, Furukawa A, Koike C, Tamaki Y, et al. (2006) Cloning and characterization of mr-s, a novel SAM domain protein, predominantly expressed in retinal photoreceptor cells. *BMC Dev Biol* 6: 15.
26. Matsuda T, Cepko CL (2004) Electroporation and RNA interference in the rodent retina in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 16-22.
27. Langmann T, Lai CC, Weigelt K, Tam BM, Warneke-Wittstock R, et al. (2008) CRX

- controls retinal expression of the X-linked juvenile retinoschisis (RS1) gene. *Nucleic Acids Res* 36: 6523-6534.
28. Sanuki R, Omori Y, Koike C, Sato S, Furukawa T (2010) Panky, a novel photoreceptor-specific ankyrin repeat protein, is a transcriptional cofactor that suppresses CRX-regulated photoreceptor genes. *FEBS Lett* 584: 753-758.
 29. Kraus D, Karlstetter M, Walczak Y, Hilfinger D, Langmann T, et al. (2011) Retinal expression of the X-linked juvenile retinoschisis (RS1) gene is controlled by an upstream CpG island and two opposing CRX-bound regions. *Biochim Biophys Acta* 1809: 245-254.
 30. Gehrig A, Langmann T, Horling F, Janssen A, Bonin M, et al. (2007) Genome-wide expression profiling of the retinoschisin-deficient retina in early postnatal mouse development. *Invest OphthalmolVisSci* 48: 891-900.
 31. Blackshaw S, Snyder SH (1997) Developmental expression pattern of phototransduction components in mammalian pineal implies a light-sensing function. *J Neurosci* 17: 8074-8082.
 32. Tummala P, Mali RS, Guzman E, Zhang X, Mitton KP (2010) Temporal ChIP-on-Chip of RNA-Polymerase-II to detect novel gene activation events during photoreceptor maturation. *Mol Vis* 16: 252-271.
 33. Meruelo AD, Bowie JU (2009) Identifying polymer-forming SAM domains. *Proteins* 74: 1-5.
 34. Montana CL, Lawrence KA, Williams NL, Tran NM, Peng GH, et al. (2011) Transcriptional regulation of neural retina leucine zipper (Nrl), a photoreceptor cell fate determinant. *J Biol Chem* 286: 36921-36931.
 35. Hao H, Kim DS, Klocke B, Johnson KR, Cui K, et al. (2012) Transcriptional Regulation of Rod Photoreceptor Homeostasis Revealed by In Vivo NRL Targetome Analysis. *PLoS Genet* 8: e1002649.
 36. Yoshida S, Mears AJ, Friedman JS, Carter T, He S, et al. (2004) Expression profiling of the developing and mature Nrl^{-/-} mouse retina: identification of retinal disease candidates and transcriptional regulatory targets of Nrl. *Hum Mol Genet* 13: 1487-1503.
 37. Omori Y, Katoh K, Sato S, Muranishi Y, Chaya T, et al. (2011) Analysis of transcriptional regulatory pathways of photoreceptor genes by expression profiling of the Otx2-deficient retina. *PLoS One* 6: e19685.
 38. Baker DA, Mille-Baker B, Wainwright SM, Ish-Horowicz D, Dibb NJ (2001) Mae mediates MAP kinase phosphorylation of Ets transcription factors in *Drosophila*. *Nature* 411: 330-334.
 39. Qiao F, Song H, Kim CA, Sawaya MR, Hunter JB, et al. (2004) Derepression by depolymerization; structural insights into the regulation of Yan by Mae. *Cell* 118: 163-173.

40. Aldiri I, Vetter ML (2012) PRC2 during vertebrate organogenesis: a complex in transition. *Dev Biol* 367: 91-99.

6. Abkürzungen

Atp5b	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide
bp	base pairs
BSA	bovine serum albumin
CBR	Crx-bound region
CBS	Crx-bound sequence
cDNA	complementary DNA
ChIP-seq	chromatin immunoprecipitation-sequencing
Crx	cone rod homeobox
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	deoxyribonucleic acid
dsRed	discosoma sp. red fluorescent protein
Epha4	ephrin type-A receptor 4
Ephb2	ephrin type-B receptor 2
Ets	E-twenty six
FAM161A	family with sequence similarity 161, member A
FCS	fetal calf serum
GFP	green fluorescent protein
HDAC	histone deacetylase
HEK293	Human Embryonic Kidney 293 cells
Mae	modulator of the activity of Ets
MAK	male germ cell-associated kinase
Mph1	mutator phenotype 1
mRNA	messenger RNA
mr-s	major retinal SAM domain protein
Nr2e3	nuclear receptor subfamily 2 group E member 3
Nrl	neural retina leucine zipper

Otx2	orthodenticle homeobox 2
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
Phc1	polyhomeotic homolog 1
Phc2	polyhomeotic homolog 2
PRC2	polycomb repressive complex 2
qRT-PCR	real-time-quantitative-PCR
RIPA	radio-immunoprecipitation assay
RNA	ribonucleic acid
RNAi	RNA interference
Ror β	retinoid related orphan receptor beta
RS1	retinoschisin 1
RT-PCR	reverse transcription PCR
SAM	sterile alpha motif
Samd7	sterile alpha motif 7
SDS(-PAGE)	sodium dodecyl sulfate (polyacrylamide gel electrophoresis)
shRNA	small hairpin RNA
Tel	translocation–Ets–leukemia
Thr β 2	thyroid hormone receptor beta 2

Sterile Alpha Motif Containing 7 (Samd7) Is a Novel Crx-Regulated Transcriptional Repressor in the Retina

Julia Hlawatsch^{1,9}, Marcus Karlstetter^{1,2,9}, Alexander Aslanidis^{1,2,9}, Anika Lückhoff², Yana Walczak^{1,2}, Michael Plank¹, Julia Böck¹, Thomas Langmann^{1,2*}

¹ Institute of Human Genetics, University of Regensburg, Regensburg, Germany, ² Department of Ophthalmology, University of Cologne, Cologne, Germany

Abstract

Inherited retinal diseases are mainly caused by mutations in genes that are highly expressed in photoreceptors of the retina. The majority of these genes is under the control of the transcription factor Cone rod homeobox (Crx), that acts as a master transcription factor in photoreceptors. Using a genome-wide chromatin immunoprecipitation dataset that highlights all potential *in vivo* targets of Crx, we have identified a novel sterile alpha motif (SAM) domain containing protein, Samd7. mRNA Expression of Samd7 was confined to the late postnatal and adult mouse retina as well as the pineal gland. Using immunohistochemistry and Western blot, we could detect Samd7 protein in the outer nuclear layer of adult mouse retina. Ectopic over-expression in HEK293 cells demonstrated that Samd7 resides in the cytoplasm as well as the nucleus. *In vitro* electroporation of fluorescent reporters into living mouse retinal cultures revealed that transcription of the Samd7 gene depends on evolutionary conserved Crx motifs located in the first intron enhancer. Moreover, Crx knock-down with shRNA strongly reduced Samd7 reporter activity and endogenous Samd7 protein, indicating that Crx is required for retinal expression of Samd7. Finally, using co-transfections in luciferase reporter assays we found that Samd7 interferes with Crx-dependent transcription. Samd7 suppressed luciferase activity from a reporter plasmid with five Crx consensus repeats in a dose dependent manner and reduced Crx-mediated transactivation of regulatory sequences in the retinoschisin gene and the Samd7 gene itself. Taken together, we have identified a novel retinal SAM domain protein, Samd7, which could act as a transcriptional repressor involved in fine-tuning of Crx-regulated gene expression.

Citation: Hlawatsch J, Karlstetter M, Aslanidis A, Lückhoff A, Walczak Y, et al. (2013) Sterile Alpha Motif Containing 7 (Samd7) Is a Novel Crx-Regulated Transcriptional Repressor in the Retina. PLoS ONE 8(4): e60633. doi:10.1371/journal.pone.0060633

Editor: Karl-Wilhelm Koch, University of Oldenburg, Germany

Received: May 18, 2012; **Accepted:** March 1, 2013; **Published:** April 2, 2013

Copyright: © 2013 Hlawatsch et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Funds were provided by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (LA1203/6-2, LA1203/8-1), the Pro Retina Stiftung and the Hans und Marlies Stock-Stiftung. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: TL is academic editor of PLOS ONE. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

* E-mail: thomas.langmann@uk-koeln.de

⁹ These authors contributed equally to this work.

Introduction

Rods and cones of the retina are highly specialized cells required for phototransduction, the biochemical key step of visual perception. Up to now, mutations in more than 170 inherited retinal disease genes have been identified, which often lead to malfunction of retinal cells and progressive retinal degeneration (Retnet database, <http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/>). Within this large group of causative genes, defects in retina-specific genes and key transcription factors are frequently associated with inherited retinal dystrophies [1]. There is a strong correlation between high transcript levels of a gene in photoreceptors and a dysfunction of the corresponding protein, which can subsequently lead to retinal disease [2]. Therefore, the identification of abundantly expressed genes in the retina and knowledge about their regulation may help to find yet unknown genetic causes for retinopathies.

Photoreceptor-specific gene regulation is controlled by a hierarchical network of transcription factors including orthodenticle homeobox 2 (Otx2) [3], cone rod homeobox (Crx) [4,5], neural retina leucine zipper (Nrl) [6], nuclear receptor subfamily 2 group E member 3 (Nr2e3) [7], thyroid hormone receptor beta 2 (Thrb2) [8], and retinoid related orphan receptor beta (Rorb) [9].

Crx is present in developing as well as adult rod and cone photoreceptors, where it critically influences the transcription of most photoreceptor-specific genes [10]. Accordingly, Crx acts like a classical terminal selector gene, which maintains and controls the terminally differentiated state of rods and cones [11]. ChIP-seq experiments in the mouse retina revealed that Crx coordinates the expression of several hundreds of photoreceptor genes including most retinal disease genes [12]. In a candidate-gene prioritization strategy based on these Crx ChIP-seq data, two novel retinitis pigmentosa genes, FAM161A and MAK, were recently identified [13,14]. Thus, the Crx ChIP-seq dataset is highly useful to identify novel retina-specific genes and define novel targets for genetic analyses.

Sterile alpha motif (SAM) domains are 70 amino acid long protein-protein interaction domains, which are present in a variety of proteins from different functional classes [15]. These proteins often self-associate via their SAM domains and some form polymeric complexes, which is required for modulation of functional activity [16]. SAM proteins can act as kinases [17], regulatory enzymes [18], scaffolding proteins [19], RNA-binding proteins [20,21], and transcriptional regulators [22,23]. The Ets transcription factor Yan contains a SAM domain and is a negative regulator of photoreceptor development [24]. Major retinal SAM

domain protein (Mr-s, alias Samd11) was identified as the first SAM domain protein predominantly expressed in rod photoreceptor cells and the pineal gland [25]. Mr-s, which contains an isolated SAM domain, is regulated by Crx and likely functions as a transcriptional repressor involved in photoreceptor development [25].

In this study, we cloned and characterized Samd7, the hitherto second SAM domain containing protein specifically expressed in the mammalian retina and pineal gland. Samd7 is confined to the outer nuclear layer of the developing and adult mouse retina and its transcription is controlled by Crx-bound *cis*-regulatory elements. We found that Samd7 is mainly localized in the nucleus, where it blocks Crx-dependent transcription from retina-specific promoters including those from the retinoschisin gene and the Samd7 gene itself. These findings propose a novel role for Samd7 in transcriptional regulation of retina-specific genes.

Materials and Methods

Mouse husbandry

CD1 and C57BL/6 mice were purchased from Charles River Laboratories (Sulzfeld, Germany) and maintained on a 12 hour light/dark schedule at 22°C with free access to water and food. The health of the animals was regularly monitored, and all procedures were approved by the University of Regensburg animal rights committee and complied with the German Law on Animal Protection and the Institute for Laboratory Animal Research Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 1999.

DNA constructs

Mouse retinal cDNA was used to amplify the full-length Samd7 open reading frame using forward primer 5'-cccaagcttatgacaacc-caatgatgtctgtgag-3' and reverse primer 5'-cccgaattcttaattctca-taactgttctctag-3'. The PCR-product was cloned into the pFLAG-CMV-4 vector (Sigma Aldrich) at restriction sites *HindIII* and *EcoRI*. The clone was validated by cycle sequencing with vector-specific and internal primers. The pCAG-GFP and No-basal/Rho-basal dsRed vectors have been described previously [12]. The RNAi vector pBS/U6-Crx-shRNA has been described previously [26] and the plasmid pLKO.1 scramble shRNA was purchased from Addgene.

To create the Samd7-CBR1-dsRed construct, PCR was used to amplify a 495 bp region of the mouse Samd7 promoter region using forward primer 5'-tccccggaattcgccattctcacctagagca-3' and reverse primer 5'-ttcggtgtacgccttctgacagctctt-3'. The promoter fragment was subcloned upstream of dsRed in the no-basal reporter vector using *EcoRI* and *KpnI* restriction enzymes. The 581 bp insert of the Samd7-CBR2-dsRed construct was amplified from mouse genomic DNA with forward primer 5'-tccccctagatgtggg-caactcaaacct-3' and reverse primer 5'-tccccggaattcagacgccactctg-gatggt-3'. The intron fragment was subcloned in the Rho-basal reporter vector at *XbaI* and *EcoRI* restriction sites. Site-directed mutagenesis was performed to replace the central core motif of Crx binding sites within Crx-bound region 2 (CBR2) using the QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA). In general, the TAAT site was substituted by CCCC nucleotides. The following primers were used for mutagenesis: CBR2/CBS1, forward 5'-cgtctgaaggcagcgcgccag-gcatctcat-3', reverse 5'-aggatgaagatgcctggggcgctgcctcag-3', CBR2/CBS2, forward 5'-catcttcacctgcctggcgctggccatcag-3', reverse 5'-ggatggccagcagcggggcaggatgaagatgcc-3', CBR2/CBS3, forward 5'-ggccatccaggcccgagctctgggtcagag-3', reverse 5'-accga-gagctcggggcctggatggccagac-3', CBR2/CBS4, forward 5'-

ctctgtttttagccccagacacactctaca-3', reverse 5'-gagtgtgtctggggggct-caaacagagagg-3'.

To clone the Samd7-CBR1-Luciferase construct, PCR was used to amplify a 495 bp region of the mouse Samd7 promoter region using forward primer 5'-ttcggtgtacgccttctcacctagagca-3' and reverse primer 5'-ggtagcgtcaggccttctgacagctctt-3'. The promoter fragment was subcloned upstream of luciferase in the pGL4.10 reporter vector using *KpnI* and *XhoI* restriction enzymes. The Rsl luciferase construct has been described previously [27]. Design and cloning of the p5x-Crx-tk-Luc plasmid was published recently [28].

Immunohistochemistry

For retinal immunofluorescence studies, cryo-sections were fixed with 4% paraformaldehyde and rinsed with PBS. Sections were then rehydrated in PBS and preincubated with 1% dried milk in PBS and 0.01% Tween 20 to reduce nonspecific staining. Overnight incubation with the primary anti-Samd7 antibody (Q-12, Sc100141, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) was performed at 4°C in PBS containing 2% BSA, 0.02% NaN₃ and 0.1% Triton X-100. After washing in PBS, samples were labeled for 1h at room temperature with the secondary goat anti-rabbit antibody conjugated to Alexa594 (red) (Dianova, Hamburg, Germany). Nuclei counter-staining was performed with 0.1 µg/ml 4',6-diamidino-2-phenylindol in PBS (Molecular Probes, Life Technologies, Frankfurt, Germany) for 10 min at room temperature. The cryo-sections were mounted with fluorescent mounting medium (Dako Cytomation, Hamburg, Germany) and viewed with a Zeiss Axio Imager fluorescence microscope equipped with ApoTome.2 (Carl Zeiss, Jena, Germany). Microscopic pictures were analyzed with ZEN software (Carl Zeiss, Jena, Germany).

Immunocytochemistry

HEK293 cells were seeded on glass coverslips and transfected with the Flag-Samd7 expression plasmid for 48 hours. Slides were fixed with 4% paraformaldehyde, washed with PBS and incubated in blocking buffer containing 10% goat serum and 0.3% Triton X-100. Cells were then incubated with the anti-Samd7 antibody (Q-12, Sc100141, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) or the anti-Flag antibody (#2368, Cell Signaling technology, Cambridge, UK) in a solution containing 2.5% goat serum and 0.1% Triton X-100 for 1 hour at room temperature. After 30 min incubation with the secondary antibody conjugated to Alexa594 (red), slides were washed with PBS and counterstained with DAPI in PBS. Labeled cells were viewed with a Zeiss Axio Imager fluorescence microscope equipped with ApoTome.2 (Carl Zeiss, Jena, Germany). Microscopic pictures were analyzed with ZEN software (Carl Zeiss, Jena, Germany).

Western blot analysis

Mouse retinal tissue was homogenized in cold RIPA buffer (50 mM Tris/HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, and protease inhibitors) using a TissueLyser (Qiagen, Hilden, Germany). Insoluble debris was removed by centrifugation for 5 min at 5000 g. HEK293 cells transfected with Flag-Samd7 and mock vectors were directly lysed in RIPA buffer. Nuclear and cytoplasmic extracts were prepared using the NE-PER nuclear protein extraction kit according to the instructions of the manufacturer (Thermo Scientific, Schwerte, Germany). Protein concentrations were determined by Bradford assay (Roti-quant, Roth, Karlsruhe, Germany). 30 µg of proteins were separated by SDS-PAGE on 10% gels with PageRuler prestained protein ladder (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Proteins were then transferred to 0.45 µm nitrocellulose

membranes (Biorad, Munich, Germany). After blocking in PBS containing 3.5% nonfat dry milk, membranes were incubated with primary antibodies against Samd7 (Q-12, Sc100141, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), Flag tag (#2368, Cell Signaling technology, Cambridge, UK), or beta-actin (mAbcam 8224, Cambridge, UK). Blots were then incubated with secondary goat anti-rabbit IgG antibodies conjugated to horseradish peroxidase. Western blot signals were visualized with the Multi-image II system (Alpha Innotech, Santa Clara, CA, USA).

In vitro electroporation and culture of explanted retinas

In vitro electroporation of explanted retinas was performed as described previously [12]. Briefly, retinas from P0 wild-type CD1 mouse pups were dissected and placed into a microslide chamber containing a mixture of pCAG-GFP as loading control and the reporter construct driving dsRed expression. Retinas were subjected to five 30 V pulses with 50 ms in length and 950 ms apart using an ECM 830 square-wave electroporator (BTX Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). Each construct was electroporated into three different retinas and three independent electroporations were performed. The retinas were then rinsed in medium and placed on circular Nucleopore filters (25 mm, 0.2 mm; VWR, Darmstadt, Germany) with the lens facing the membrane. After eight days of *in vitro* culture, retinas were fixed and imaged in both flat-mounts and cross-sections. For quantification of promoter activities, dsRed fluorescence was determined and normalized to GFP control fluorescence as described before [29]. Briefly, retinal flat-mount images were captured for the red and the green channels using a fluorescence microscope (Axioskop2 MOT Plus, Zeiss, Jena, Germany). Five regions of interest within each retina and three regions outside each retina were defined using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Then, the mean background-subtracted pixel intensity of the experimental red channel was divided by the mean pixel intensity of the green control channel for normalization.

Transient transfections, luciferase and beta-Gal assays

HEK293 cells were cultured in DMEM containing 10% FCS, 100 U/ml penicillin/streptomycin at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Cells in 12-well plates were transfected with 0.2 µg of reporter plasmid using the TransIT-LT1 Transfection Reagent (Mirus, Madison, WI, USA) following the manufacturer's instructions. For co-transfections, 0.2 µg luciferase plasmid were used together with various concentrations of pcDNA4/HisMax-Crx, pcDNA4/-Samd7, or empty expression vector. 0.4 µg pSV beta-galactosidase vector (Promega) were co-transfected in each reaction to control for transfection efficiency. Cells were harvested 24h after transfection by scraping in 1x lysis buffer (Promega, Madison, WI, USA). For luciferase assays, 20 µl of cytosolic extract and 100 µl of luciferase assay reagent were mixed and light emission was measured with a Tecan Infinite F200 pro reader (Tecan, Crailsheim, Germany). All data were normalized for beta-galactosidase activity using the Promega beta-galactosidase enzyme assay (Promega), calculating the absorbance at 420 nm. Fold activation was calculated relative to control transfected cells. For each construct, at least six independent experiments were performed. Statistical significance was determined using One-way Analysis of Variance and Tukey's Post Hoc Test.

RNA-Isolation, RT-PCR and quantitative (real-time) RT-PCR

Total RNA was isolated from different mouse tissues and retinas at different postnatal ages using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). RNA quality was assessed on the Agilent 2100 Bioanalyzer with the RNA 6000 Nano LabChip reagent kit (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Reverse transcription was performed using the RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis kit (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany).

RT-PCR to amplify 563 bp of mouse Samd7 from stomach, lung, liver, testis, kidney, spleen, brain, retina, heart, muscle, and pineal gland was performed with 50 ng cDNA and primers forward, 5'-tcacttctactcaggctgggcca-3' and reverse, 5'-gttctcgtgggggttgccg-3'. A 293 bp product of Samd11 was amplified from pineal gland cDNA using primers forward, 5'-tgtccagccagccaaccaag-3' and reverse, 5'-tgtgtctcctcatcagtgaga-3'. A 292 bp fragment of β-actin was amplified as reference with primers forward, 5'-accacactgtgccatcta-3' and reverse, 5'-cggaacgctcattgcc-3' using the Taq Core kit (Qiagen, Hilden, Germany) and standard PCR conditions with 25 cycles.

qRT-PCR was carried out with the TaqMan 7900HT PCR detection system (Invitrogen Life Technologies, San Diego, CA) in 10 µl reaction mixture containing 1x TaqMan Gene Expression Master Mix (Invitrogen Life Technologies), 200 nM primers and 0.25 µl dual-labeled probe (Roche Universal Probe Library, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). For the detection of mouse Samd7 transcripts, intron-spanning primers forward, 5'-tgatggaaagaatggggtt-3' and reverse, 5'-tctgagtcaacctgctcat-3' were combined with universal probe # 34. Atp5b was amplified as stable reference gene using primers forward, 5'-ggcacaatgcaggaaagg-3' and reverse, 5'-tcagcaggcacatagatagcc-3' together with probe # 77. The PCR reaction parameters were as follows: 40 s at 95°C melting, 1 min at 60°C annealing, and 2 min at 72°C extension. Each run was performed for 40 cycles and each measurement was performed in biological triplicates. PCR efficiencies of both products were determined with serial dilutions of mouse retinal cDNA and were shown to be >90% (Figure S1). Results were analyzed with the ABI sequence detector software version 2.3 using the ΔΔCt method for relative quantitation.

Results

Cloning of mouse Samd7

We have recently analyzed the targetome of the retinal transcription factor Crx using chromatin immunoprecipitation with massively parallel sequencing (ChIP-seq) [12]. Using this dataset, we have now identified a previously uncharacterized SAM domain containing protein, Samd7. In the ChIP-seq dataset, Samd7 was the gene locus with most Crx ChIP-seq reads (data not shown), indicating high expression and a putative important function in the mouse retina. To clone the 445 amino acid open reading frame (ORF) of the mouse Samd7 gene, we carried out RT-PCR with cDNA from 2 month old mouse retina. The Samd7 ORF contains an isolated SAM domain in the C-terminal part (Figure 1A), which exhibits high homology with SAM domains of the known proteins Samd4, EphA4, Ephb2, Tel, Samd11, Phc2, Mph1, and Phc1 (Figure 1B). Phylogenetic analysis indicated that the closest relative of Samd7 is Samd11, which also lacks further known protein domains (Figure 1C). Samd11 has been recently characterized as *major retinal SAM domain protein* (Mr-s), which may function as a transcriptional repressor in photoreceptor cells [25]. The mouse Samd7 ORF and especially its SAM domain is highly conserved in rat, human, chicken and zebrafish (Figure 1D). Samd7 maps to mouse chromosome 3A3. The human ortholog

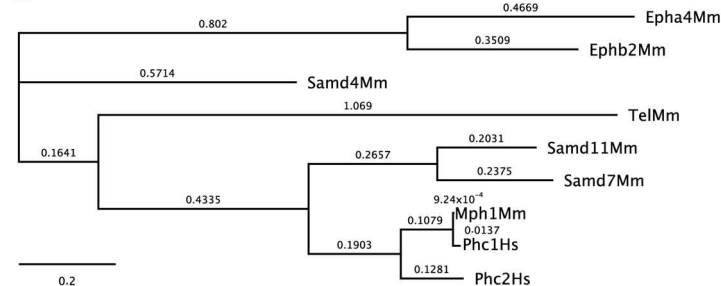
A

[illegible]

B

¹ 20 30 40 50 60 70 77
Samd4Mm THVPAKSRSPN-LHKYALSSQM-TYEE---DAIDVTCQEQAGN-VTKGRKSVISQKLE
EphA4Mm EEFSAVSAGVGDTPAKR-MDRYKYSIAA-GFTSDVVSQSSDDPARGITLGHKSNLSQAMKRTQOMH
EphB2Mm LEQTSFNTVDVTPAKR-HQKYKSSANA-GFTSDVVSQSSDDPARGITLGHKSNLSQAMKRTQOMH
EphA2Mm LQVTSFNTVDVTPAKR-HQKYKSSANA-GFTSDVVSQSSDDPARGITLGHKSNLSQAMKRTQOMH
Samd11Mm VNKVTTVDVNVAGSGCSEYARVSGE-CIDG-ETPLTFLHEHNTMCKIKGIPALKRKAQAKRLR
Samd7Mm LQKWTVDVNVNIPSPGCSGYARVQKDR-AIDG-ETPLTFLHEHNTMCKIKGIPALKRKAQAKRLR
Phc2Hs EFKWNVEDVNVNIPSPGCSGYARVQKDR-AIDG-ETPLTFLHEHNTMCKIKGIPALKRKAQAKRLR
Mph1Mm SNPSQNVNVDVNVNIPSPGCSGYARVQKDR-AIDG-ETPLTFLHEHNTMCKIKGIPALKRKAQAKRLR
Phc1Hs SNPSQNVNVDVNVNIPSPGCSGYARVQKDR-AIDG-ETPLTFLHEHNTMCKIKGIPALKRKAQAKRLR

C



D

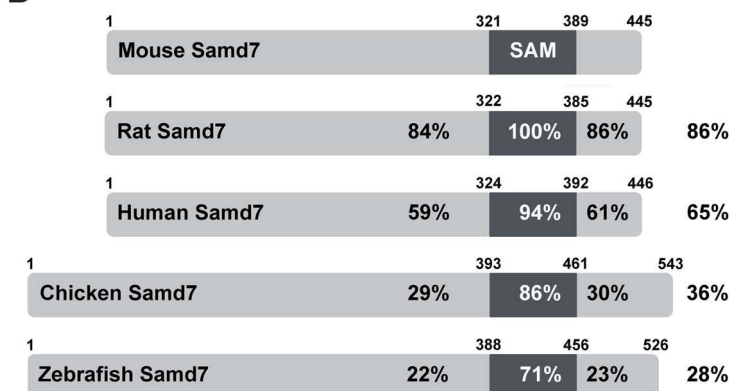


Figure 1. Samd7 is a novel phylogenetically conserved SAM-domain protein. A: The full-length Samd7 protein comprises 445 amino acids including a 67 aa SAM domain, which is indicated by a box. B: Amino acid alignment of selected SAM domain sequences using Clustal W Blosum 62. The level of similarity is indicated by shading ranging from 100% (black) to less than 60% (light gray). C: Phylogenetic conservation of SAM-domain containing proteins. The branch length represents the number of substitutions that have occurred in that branch and the distance scale represents the number of differences between sequences, with 0.1 meaning 10% difference between two sequences. D: Amino acid sequence similarities of mouse, rat, human, chicken, and zebrafish Samd7 proteins. The percentage of similarity is shown for the full-length protein as well as for individual regions of the protein, respectively.
doi:10.1371/journal.pone.0060633.g001

resides at 3q26.2, which does not harbor a retinal disease candidate locus so far.

Samd7 is expressed in the mouse retina and pineal gland

To compare retinal mRNA expression of Samd7 with other SAM domain proteins that lack additional functional domains, a DNA-microarray dataset that was previously published by our group was screened [30]. Seven SAM domain only proteins were present on the microarray and Samd11 (alias Mr-s) showed highest expression levels in the postnatal day (P) 7 retina (Figure 2A). Samd7 and Samd14 were also significantly expressed in the retina, whereas Samd4, Samd5, Samd10, and Samd12 were only weakly expressed (Figure 2A). To analyze the tissue specificity of Samd7 expression, transcript levels were amplified in various adult mouse tissues using RT-PCR. We observed that Samd7 was highly expressed in the retina but was not found in stomach, lung, liver, testis, kidney, spleen, brain, heart, or muscle (Figure 2B). As many photoreceptor-specific genes, including the related Samd11 gene, are expressed in the pineal gland [25,31], we next analyzed Samd7 transcripts in this tissue. RT-PCR amplification verified the previously described weak Samd11 expression [25] and showed a strong band specific for Samd7 (Figure 2C). We then investigated the temporal expression of Samd7 mRNA in the late stages of mouse retinal development using real-time qRT-PCR. Weak transcript levels were detected at birth and between P1 and P3 (Figure 2D). At P5, Samd7 showed a peak of expression, which slowly declined to intermediate levels at higher mouse ages (Figure 2D). The early expression pattern of Samd7 clearly parallels the maturation of photoreceptors and we thus speculate that the protein functions mainly in terminally differentiated photoreceptors.

Samd7 is localized to the outer nuclear layer of the retina and resides in the cytoplasm and nucleus of transfected cells

Given the high mRNA expression in the retina, our next goal was to determine the localization of the Samd7 protein in the mouse retina. We first performed immunohistochemistry of adult mouse retinal sections using a commercial anti-Samd7 antibody. These experiments showed that Samd7 was predominantly expressed in the outer nuclear layer, where rod and cone photoreceptors reside (Figure 3A). We then performed Western blot analysis to confirm specificity of the antibody. The 49 kDa Samd7 protein was detected as a specific band in retinal extracts from adult mice (Figure 3B). To further corroborate antibody specificity, we cloned and expressed a recombinant Flag-tagged Samd7 protein in HEK293 cells. A specific band of 51 kDa was detected with both, the anti-Flag antibody and the anti-Samd7 antibody (Figure 3C). This result confirms that the anti-Samd7 antibody specifically recognizes Samd7.

To study the subcellular localization of Samd7 in mammalian cells, we again analyzed HEK293 cells transiently transfected with a full-length Flag-tagged Samd7 expression construct. Cell lysates were separated into cytoplasmic and nuclear fractions and Western blots were performed. Using the anti-Flag and the anti-

Samd7 antibody, corresponding Samd7 bands were identified in the cytoplasm as well as the nuclear fractions. Stronger signals were detected in the nuclear fractions which were often seen as double bands with slightly different molecular weights at an approximate size of 51 kDa (Figure 3D). We next analyzed mock-transfected and Samd7 transfected cells with immunocytochemistry using anti-Flag and anti-Samd7 antibodies (Figure 3E-P). Fluorescence microscopy of immunostained cells which were counter-stained with DAPI showed a predominant nuclear localization of Samd7 (Figure 3H-J, N-P). These data suggest that a significant portion of Samd7 protein resides in the nucleus. Interestingly, its closest relative Samd11 also shows a predominant distribution in the nucleus when transfected into HEK293 cells [25].

Samd7 transcription is controlled by Crx

The identification of Samd7 as *in vivo* target of Crx in the Crx ChIP-seq study [12] and its retina-specific expression suggests that Samd7 transcription is directly regulated by Crx. We inspected the location of retinal Crx ChIP-seq reads at the Samd7 locus and identified two Crx-bound regions (CBRs) in the promoter region and the first intron, respectively (Figure 4A). Sequence analysis of a recently published RNA Polymerase II ChIP-chip dataset [32] also showed a significant Pol II association with the promoter region of Samd7 at postnatal day 2 (Figure 4A). At postnatal day 25, when the retina is fully developed, Pol II peaks were identified at the promoter as well as in the first intron. These Pol II bound regions fully overlap with both CBRs (Figure 4A), indicating that these regulatory sites indeed function as initiation and elongation sites of Samd7 transcription in the adult retina.

Bioinformatic sequence analysis using MatInspector then showed that CBR1 contains three canonical Crx binding sequences (CBS1–3), whereas CBR2 contains four CBS (Figure 4A). A nearly perfect phylogenetic conservation of Crx sites was found in CBS1 and CBS3 residing within CBR2 (Figure 4B). To test whether CBR1 and CBR2 represent active *cis*-regulatory regions, CBR-dsRed reporter fusions were electroporated into living mouse retinas. CBR1 located in the proximal promoter region of the Samd7 gene failed to drive detectable dsRed expression in the retina (Figure 4C). In contrast, intronic CBR2 upstream of a minimal rhodopsin promoter, which by itself is not active, drove strong expression with a predominant fluorescence signal in the outer nuclear layer, where photoreceptors are localized (Figure 4C). To evaluate the contribution of individual Crx binding sites to the strong activity of CBR2, site-directed mutagenesis was performed in the critical Crx core motifs. Mutations in all four CBS of CBR2 simultaneously resulted in a complete loss of activity in electroporated retinal explants (Figure 4C). Electroporations with four constructs that eliminated each CBS independently were then performed and fluorescence levels were quantified. Mutation of CBS1 and CBS3 nearly abolished enhancer activity, whereas mutagenesis of CBS2 and CBS4 had no major effect (Figure 4D). To analyze whether the same sites of intronic CBR2 also enhance activity of its own promoter, mutant CBR2 fragments were cloned upstream of CBR1 and the reporter

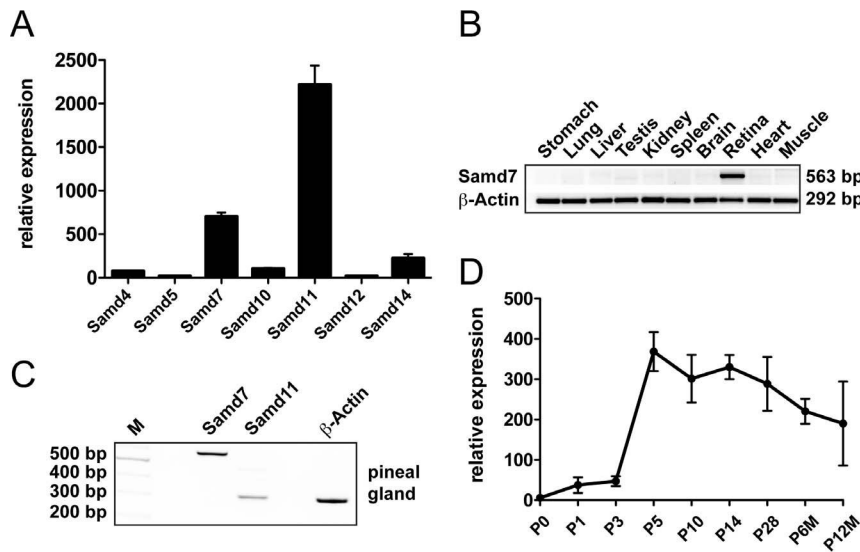


Figure 2. Samd7 is expressed in the mouse retina and pineal gland. A: Relative mRNA expression of all SAM-domain containing proteins with isolated SAM domains in postnatal day 7 mouse retinas. Mean signal intensities of three independent Affymetrix mouse expression 430A arrays (GEO accession number GSE5581) show that Samd7 is the second most abundant transcript in the retina. B: RT-PCR analysis of total RNAs extracted from mouse stomach, lung, liver, testis, kidney, spleen, brain, retina, heart, and muscle reveals retina-specific mRNA expression of Samd7. C: RT-PCR analysis of total RNA extracted from mouse pineal gland. Primer pairs specific for Samd7, Samd11 and beta-actin were used for PCR. D: Real-time qRT-PCR analysis of early postnatal and adult retina demonstrates that Samd7 expression peaks at postnatal day 5 and then stays at intermediate levels. doi:10.1371/journal.pone.0060633.g002

activity was determined. In accordance with the data from CBR2 electroporations alone, mutagenesis of CBS1 and CBS3 reduced dsRed expression, whereas nucleotide changes in CBS2 and CBS4 had no effect on reporter activity (Figure 4E). Thus, CBS1 and CBS3 in the intronic enhancer CBR2 are indispensable for Crx-regulated expression of Samd7 in the retina.

To further examine whether Crx is essential for Samd7 gene activity, we performed Crx knock-down experiments in explanted mouse retinas. Therefore, electroporations of Crx shRNA plasmids or scrambled shRNA negative controls together with the Samd7 CBR2 reporter construct were carried out. These experiments revealed a complete loss of dsRed fluorescence in flat-mount Crx knock-down retinas compared to scrambled shRNA retinas (Figure 5A). This indicates that the Crx-bound sequences in CBR2 are critically dependent on Crx. As a next step, we investigated endogenous Samd7 protein expression in the same Crx knock-down system using immunohistochemistry. In the postnatal day 8 retina co-electroporated with scrambled shRNA control, Samd7 protein was present at the border of the inner nuclear layer and the outer nuclear layer (Figure 5B, upper panel). This specific staining of Samd7 almost completely disappeared in Crx knock-down retinas (Figure 5B, lower panel), suggesting that endogenous Samd7 expression requires the presence of Crx.

Samd7 functions as a transcriptional repressor

Samd7 is localized in the ONL of the adult retina and is present in the nucleus of transfected cells. Thus, we hypothesized that the protein could be a transcriptional regulator. In the absence of an obvious DNA-binding domain, we speculated that Samd7 may interfere with the activity of retinal transcription factors like Crx. To test this hypothesis, the effect of Samd7 co-transfection on Crx-dependent promoter activity was studied with luciferase reporter assays. In the first series of experiments, we used a previously published Crx-dependent luciferase reporter which contains five repeats of Crx consensus sites under the control of a thymidine kinase minimal promoter [28]. As expected, this construct showed

a five-fold increase when Crx was co-transfected (Figure 6A). Samd7 exerted a significant dose-dependent suppressive effect on this universal Crx reporter construct (Figure 6B). We selected the most effective concentration from these titration experiments and then analyzed specific regulatory sequences. The retinal expression of the murine and human retinoschisin (RS1) gene is under the control of Crx and thus represents a bona fide Crx target gene [27]. Therefore, this promoter was selected for Crx-specific transactivation assays in the absence or presence of Samd7 expression plasmid (Figure 6C). We could confirm the results from the universal 5xCrx-tk-Luc construct and showed that Crx co-transfection strongly increased luciferase activity of a RS1 reporter construct in HEK293 cells (Figure 6C). The increased luciferase level controlled by Crx was significantly suppressed by Samd7 (Figure 6C). As the Samd7 gene itself is regulated by Crx, we next studied the effects of Samd7 co-transfection on its own promoter construct. As expected, Crx-transfection markedly increased luciferase activity of the proximal Samd7 promoter (Figure 6D). In analogy to the retinoschisin gene, Samd7 co-transfection strongly diminished reporter activity of the Samd7 gene itself (Figure 6D). These experiments suggest that Samd7 functions as a negative regulator of Crx-controlled photoreceptor-specific gene expression.

Discussion

In this study, we have cloned a novel SAM domain protein, Samd7, which is expressed in the retina and the pineal gland. The peak level of Samd7 expression is at P5, when photoreceptor cells differentiate into their functional form. Immunohistochemistry of mouse retinal sections showed that the Samd7 protein is mainly present in the outer nuclear layer. Ectopic expression of Samd7 in cultured cells revealed a distribution in the cytoplasm and the nucleus. The retinal expression and *cis*-regulatory activity of the Samd7 locus is critically controlled by a phylogenetically conserved Crx-bound enhancer region in the first intron as shown

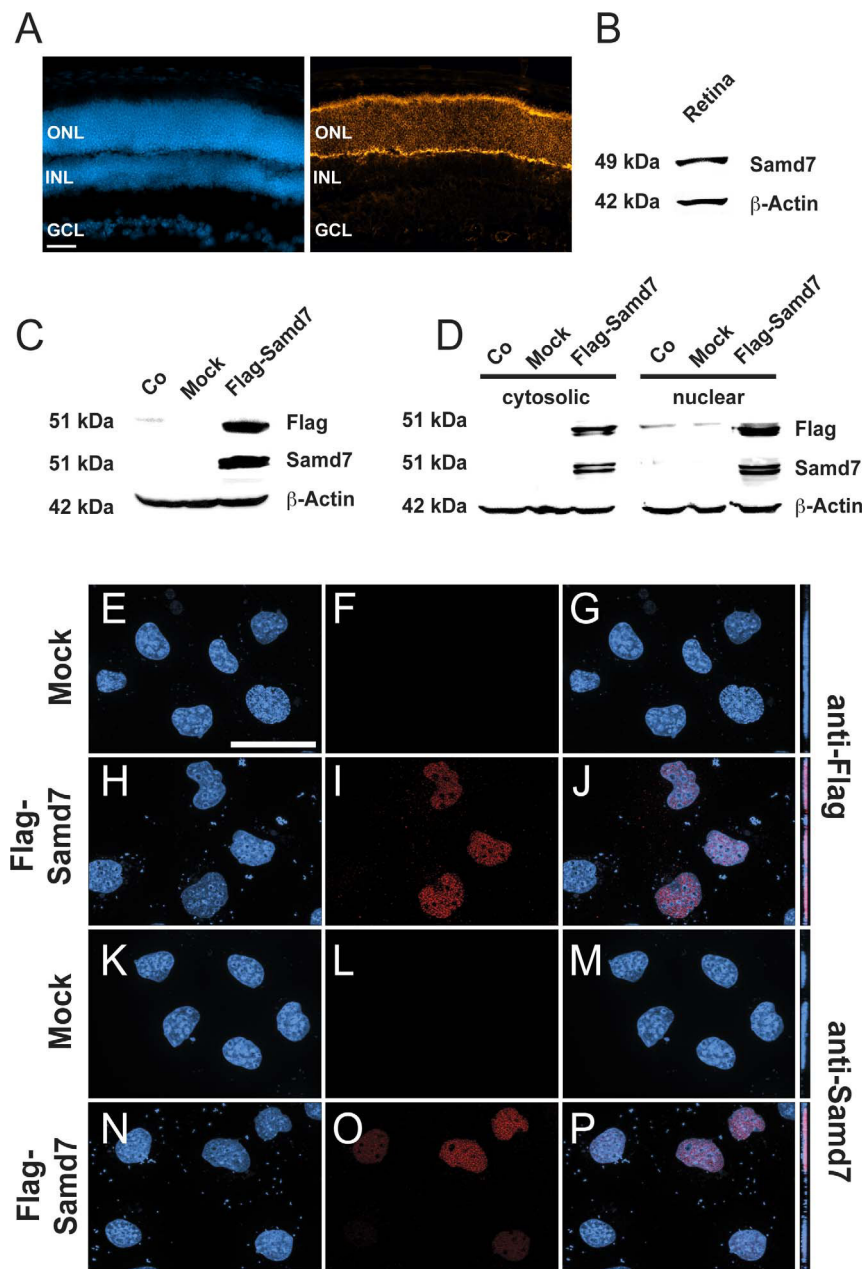
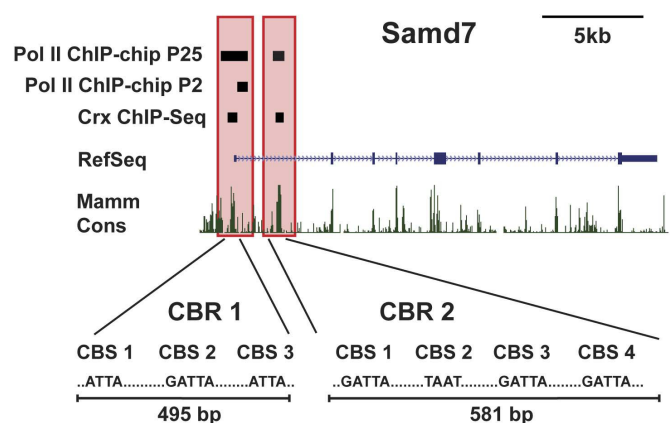


Figure 3. Samd7 is expressed in the outer nuclear layer of the mouse retina and localizes to the nucleus of transfected cells. A: Immunohistochemical analysis shows that Samd7 localizes to the outer nuclear layer in the adult mouse retina. Left panel: DAPI staining, right panel: anti-Samd7 antibody staining, ONL: outer nuclear layer, INL: inner nuclear layer, GCL: ganglion cell layer. Scale bar, 50 μ m. B: Western blot performed with retinal lysates detecting Samd7 at a molecular weight of 49 kDa and beta-actin as loading control. C: Western blot performed with protein lysates from naive HEK293 cells (Co) or HEK293 cells transfected with mock plasmid or Flag-Samd7 expression plasmid. Anti-Samd7 antibody, anti-flag antibody, and anti-beta-actin antibody were used. The Flag-Samd7 band had a molecular weight of approximately 51 kDa. D: Western blot of cytosolic and nuclear fractions of HEK293 cells transfected with mock plasmid or Flag-Samd7 expression vector. Samd7 was detected in both the cytosolic and nuclear fractions at a molecular weight of 51 kDa. (E–P): Subcellular localization of Samd7 in HEK293 cells transfected with Flag-Samd7 expression vector shown in fluorescent Z-stacked optical images. Mock transfected cells did not show a specific red signal with either the anti-Flag (F) or the anti-Samd7 (L) antibody. The anti-Flag antibody (I, J) as well as the anti-Samd7 antibody (O, P) showed a specific nuclear staining in Flag-Samd7 transfected cells when counter-stained with DAPI.
doi:10.1371/journal.pone.0060633.g003

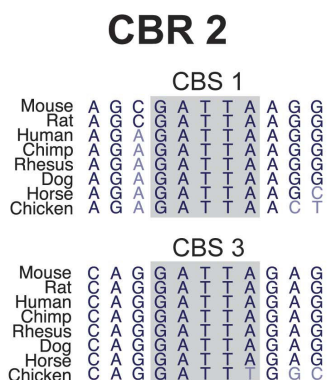
by explant electroporation and knock-down experiments. The potential function of Samd7 was further evaluated in luciferase co-transfection assays. These experiments showed that Samd7 inhibits synthetic Crx-regulatory sequences and specific promoter activities of Crx target genes and thus may function as a novel transcriptional regulator in the retina.

A major conclusion from our mRNA expression data is that Samd7 is now a second SAM domain protein with high expression levels in the retina and the pineal gland. The previously described Mr-s protein (alias Samd11) is the closest phylogenetic relative of Samd7 with a very similar expression profile [25]. Mr-s molecules can self-associate and share a relatively similar protein and SAM

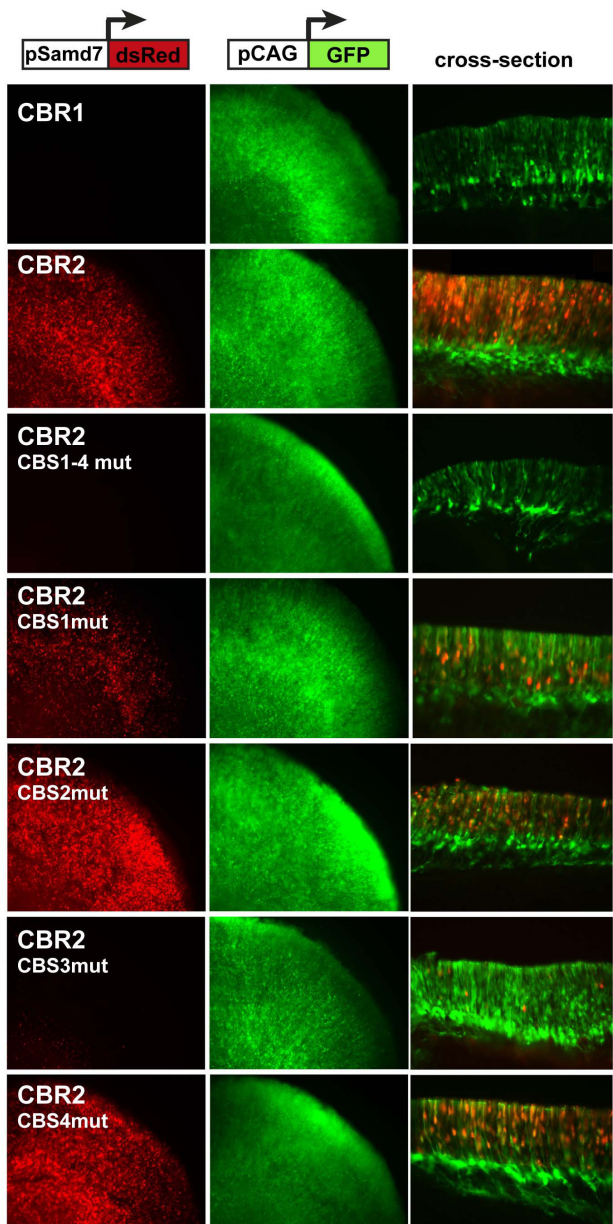
A



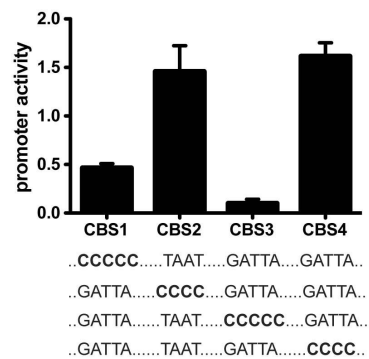
B



C



D



E

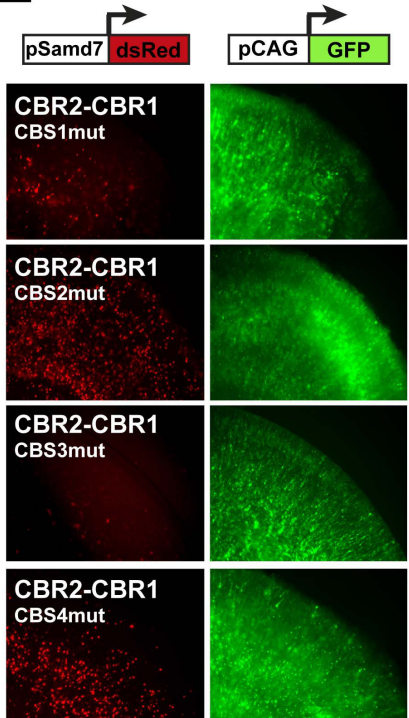


Figure 4. Samd7 transcription is regulated by Crx. A: Identification of two Crx-bound regions (CBR1 and CBR2) at the mouse Samd7 locus. Enriched Crx ChIP-seq regions are shown in the proximal promoter and first intron of Samd7 [12]. RNA polymerase II ChIP-Chip peaks at P2 and P25 [32] overlap with the Crx ChIP-Seq regions. The degree of mammalian conservation is indicated at the bottom. The nucleotide sequences of canonical Crx binding sequences (CBS) within CBR1 and CBR2 are depicted. B: The phylogenetic conservation of CBS1 and CBS2 within CBR2 is shown for several species. C-E: Activity of wild-type and mutant Samd7 CBRs in explanted mouse retinas. Co-electroporations were performed with pCAG-eGFP as control and the indicated Samd7 regulatory elements fused to dsRed. All constructs were electroporated at postnatal day 0 and the cultured explants were harvested at postnatal day 8. C: CBR1 is not active when fused to a promoterless dsRed reporter cassette. In contrast, CBR2 drives strong dsRed expression when fused to the minimal Rhodopsin promoter, which is *per se* not active. The cross-sections show that dsRed signals driven by Samd7 CBR2 were localized in the ONL, whereas the GFP signals by the ubiquitous control promoter were localized in the ONL, INL and GCL. ONL: outer nuclear layer, INL: inner nuclear layer, GCL: ganglion cell layer. D: Quantitative analysis of mutant constructs demonstrates that CBS1 and CBS3 are mandatory for high reporter expression of the intronic CBR2. E: Enhancer activity of CBR2 upstream of CBR1 also requires intact nucleotide sequences at CBS1 and CBS3.
doi:10.1371/journal.pone.0060633.g004

domain structure with Samd7 [25]. It is currently not possible to assign interactions or functions to uncharacterized SAM domains via simple computational approaches [33]. However, both Samd7 and Samd11 have an isolated SAM domain in their C-terminal part and lack further known motifs. All other family members with isolated SAM domains, namely Samd1, Samd4, Samd5, Samd10, Samd12, and Samd14 are very weakly expressed in the retina and thus are unlikely to interact with Samd7 or Samd11. Therefore, it will be very interesting to determine in the future whether the retina-specific Samd7 and Samd11 proteins can interact with each other.

Crx-dependent regulation of Samd7 in the mouse retina has been implicated by a previous ChIP-seq study, which showed two significantly enriched Crx peaks around the Samd7 locus [12]. We now could pinpoint the two relevant *cis*-regulatory regions in the promoter and the first intron of the gene using *in vitro* electroporation of reporters into mouse retinas. CBR1, which contains three Crx sites was not active alone and required interaction with the intronic enhancer elements of CBR2 to drive dsRed reporter expression. Mutagenesis of individual Crx motifs in CBR2 revealed two critical binding sites, CBS1 and CBS3, which are almost perfectly conserved among various species. The GATTA core sequence of CBS1 and CBS3 also represents a perfect matrix as deduced from bioinformatic prediction and sequence analysis of more than 5000 Crx ChIP-seq regions [10,12]. In accordance with this, the previously published Pol II-ChIP-chip dataset revealed that the promoter region and first

intron of Samd7 are actively bound by RNA-polymerase II complexes and thus initiate transcription in the adult retina [32]. Our findings define Samd7 as a bona fide Crx-regulated target gene and hence corroborate the assumption that many photoreceptor genes are surrounded by a spatially distributed network of CBRs [34]. Crx often co-regulates photoreceptor genes together with Nrl [35]. However, inspection of published datasets of Nrl^{-/-} retinas revealed no aberrant expression of Samd7 [36]. In contrast, expression profiling of the Otx2-deficient retina revealed a significant down-regulation of Samd7 mRNA levels at P12 [37]. It remains to be explored whether Samd7 is indeed a direct Otx2 target gene, or, whether the loss of Samd7 expression may have been indirectly caused by a reduced Crx expression in Otx2^{-/-} retinas.

Its site of expression in the retina, the nuclear localization, and the domain features shared with the Mr-s protein indicated that Samd7 could be a transcriptional regulator. Indeed, our *in vitro* assays showed that Samd7 interferes with Crx-mediated gene expression at synthetic consensus Crx sites and at two different retina-specific promoters. It is noteworthy that Samd7 exerted this effect without an obvious DNA binding domain. The *Drosophila* SAM protein Mae also contains solely a SAM domain and lacks DNA-binding activity [38]. Mae interacts with and facilitates phosphorylation of the transcriptional repressor Yan via direct interaction with its SAM domain [39]. Phosphorylation of Yan then results in abrogation of its repressor function and induces translocation to the cytoplasm [39]. Therefore, it is possible that

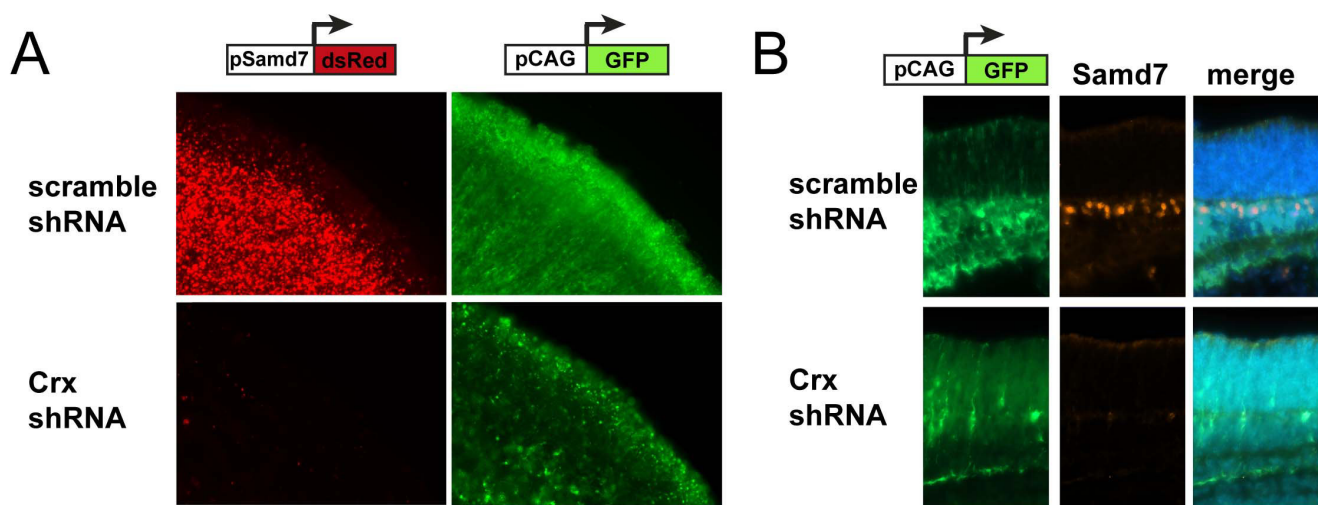


Figure 5. Samd7 expression is reduced in Crx knock-down retinas. A: Activity of wild-type Samd7 CBR2 fused to dsRed was strongly reduced in explanted P8 mouse retinas co-electroporated with Crx shRNA. B: Reduced staining of endogenous Samd7 with anti-Samd7 antibody in P8 mouse retinas electroporated with Crx shRNA compared to scramble shRNA control. pCAG-eGFP was used as electroporation control and scramble shRNA vector served as negative control for knock-down experiments. DAPI staining was performed in merged images.
doi:10.1371/journal.pone.0060633.g005

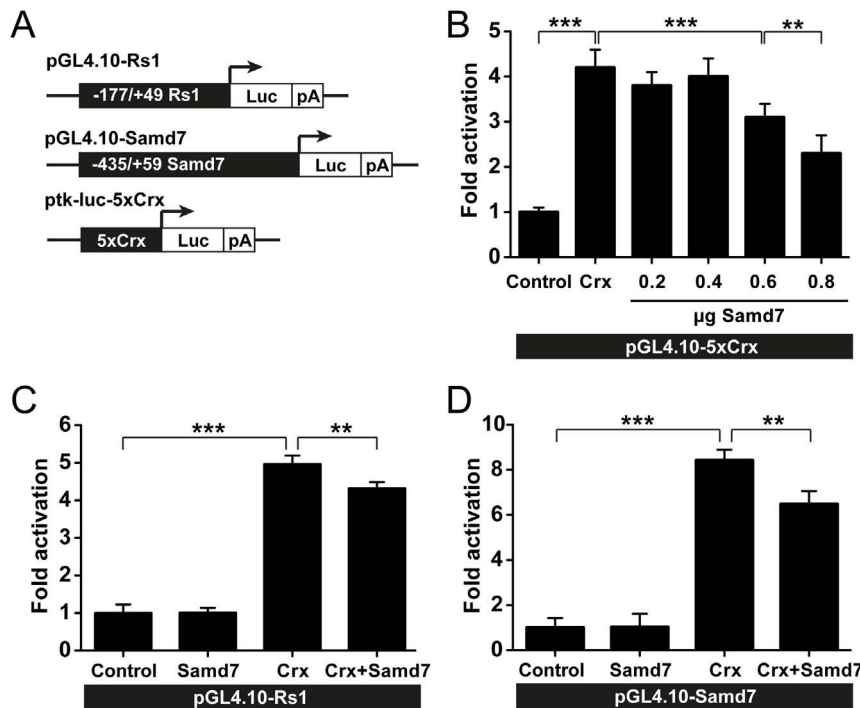


Figure 6. Samd7-dependent suppression of Crx-activated promoters. A: Schematic drawing of retinoschisin, Samd7, and 5xCrx tk Luc reporter constructs used for luciferase assays in HEK293 cells. B: The 5xCrx-tk-Luc construct was co-transfected with Crx and various concentrations of Samd7 expression plasmids. C: Samd7 expression plasmid was co-transfected in the absence or presence of Crx vector and the retinoschisin promoter activity was determined. D: Samd7 expression plasmid was co-transfected in the absence or presence of Crx vector and the Samd7 promoter activity was determined. pSV β -galactosidase vector was co-transfected in each reaction to control for transfection efficiency. Error bars represent standard deviation of the mean (n=6). ** P <0.01 and *** P <0.001 One-way Analysis of Variance and Tukey's Post Hoc Test. doi:10.1371/journal.pone.0060633.g006

Samd7 elicits its repressor function by sequestration of Crx to non-active protein complexes. *In vitro* interaction studies like pull-down assays could further clarify this question. Another possibility could be that Samd7 is part of silencing complexes involving chromatin remodeling enzymes such as histone deacetylases (HDACs). Reporter assays in the presence or absence of HDAC inhibitors like trichostatin A could help to elucidate this mechanism of repression. Samd7 could also act independently from HDACs like the SAM domain containing polycomb complex PRC2, which functions as a methyl transferase and organizes chromatin loops at target genes in their repressed states [40].

Although we have shown that Samd7 can repress transcription from Crx-dependent promoters, the *in vivo* targets of Samd7 are currently unknown. It is obvious that fine-tuning of gene expression in the retina involves activating transcription factors like Crx. However, the role of transcriptional repressors in the control of this Crx-dominated gene regulatory network is poorly understood. Recently, Panky, a photoreceptor-specific ankyrin repeat protein was identified as another transcriptional cofactor that suppresses Crx-regulated photoreceptor genes [28]. We speculate that Samd7 could have a similar function but future studies will be required to precisely clarify the role of Samd7 in retinal gene expression. Mice with targeted disruption or knock-down experiments via *in vivo* electroporation of mouse retinas will be especially helpful to answer these questions.

References

1. Rattner A, Sun H, Nathans J (1999) Molecular genetics of human retinal disease. *Annu Rev Genet* 33: 89-131.
2. Blackshaw S, Fraioli RE, Furukawa T, Cepko CL (2001) Comprehensive analysis of photoreceptor gene expression and the identification of candidate retinal disease genes. *Cell* 107: 579-589.

Supporting Information

Figure S1 PCR efficiencies of Samd7 and Atp5b real-time qRT-PCR amplifications. (TIF)

Acknowledgments

We thank Dr. Anand Swaroop (Neurobiology Neurodegeneration & Repair Laboratory, National Eye Institute) for providing the pcDNA4.1-CRX plasmid and Dr. Joseph Corbo (Department of Pathology and Immunology, Washington University School of Medicine) for sharing the pCAG-GFP plasmid, the No-basal/Rho-basal dsRed reporter vectors, and the pBS/U6-Crx-shRNA vector. We also thank Dr. Kenneth Mitton (Control of Gene Expression Laboratory, Eye Research Institute, Oakland University) for sharing retina-specific RNA-Pol II ChIP-Chip data and Dr. Takahisa Furukawa (Laboratory for Molecular and Developmental Biology, Institute for Protein Research, Osaka University) for providing the p5xCrx-tk-Luc plasmid.

Author Contributions

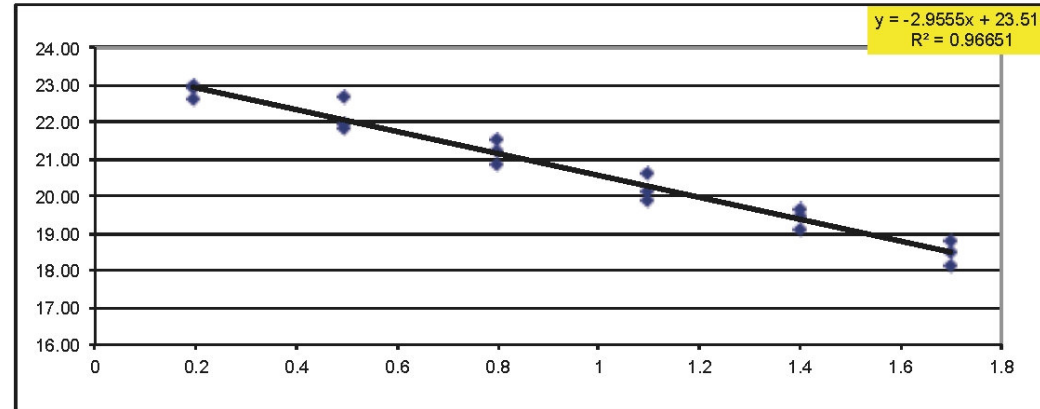
Conceived and designed the experiments: MK TL. Performed the experiments: JH MK AA AL YW MP JB. Analyzed the data: JH MK AA MP. Wrote the paper: TL.

3. Nishida A, Furukawa A, Koike C, Tano Y, Aizawa S, et al. (2003) Otx2 homeobox gene controls retinal photoreceptor cell fate and pineal gland development. *Nat Neurosci* 6: 1255-1263.
4. Chen S, Wang QL, Nie Z, Sun H, Lennon G, et al. (1997) Crx, a novel Otx-like paired-homeodomain protein, binds to and transactivates photoreceptor cell-specific genes. *Neuron* 19: 1017-1030.
5. Furukawa T, Morrow EM, Cepko CL (1997) Crx, a novel otx-like homeobox gene, shows photoreceptor-specific expression and regulates photoreceptor differentiation. *Cell* 91: 531-541.
6. Mears AJ, Kondo M, Swain PK, Takada Y, Bush RA, et al. (2001) Nrl is required for rod photoreceptor development. *Nat Genet* 29: 447-452.
7. Milam AH, Rose L, Cideciyan AV, Barakat MR, Tang WX, et al. (2002) The nuclear receptor NR2E3 plays a role in human retinal photoreceptor differentiation and degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 473-478.
8. Ng L, Hurley JB, Dierks B, Srinivas M, Salto C, et al. (2001) A thyroid hormone receptor that is required for the development of green cone photoreceptors. *Nat Genet* 27: 94-98.
9. Jia L, Oh EC, Ng L, Srinivas M, Brooks M, et al. (2009) Retinoid-related orphan nuclear receptor RORbeta is an early-acting factor in rod photoreceptor development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 17534-17539.
10. Hsiao TH, Diaconu C, Myers CA, Lee J, Cepko CL, et al. (2007) The cis-regulatory logic of the mammalian photoreceptor transcriptional network. *PLoS One* 2: e643.
11. Hobert O (2011) Regulation of terminal differentiation programs in the nervous system. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27: 681-696.
12. Corbo JC, Lawrence KA, Karlstetter M, Myers CA, Abdelaziz M, et al. (2010) CRX ChIP-seq reveals the cis-regulatory architecture of mouse photoreceptors. *Genome Res* 20: 1512-1525.
13. Langmann T, Di Gioia SA, Rau I, Stohr H, Maksimovic NS, et al. (2010) Nonsense mutations in FAM161A cause RP28-associated recessive retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet* 87: 376-381.
14. Ozgul RK, Siemiatkowska AM, Yucel D, Myers CA, Collin RW, et al. (2011) Exome sequencing and cis-regulatory mapping identify mutations in MAK, a gene encoding a regulator of ciliary length, as a cause of retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet* 89: 253-264.
15. Qiao F, Bowie JU (2005) The many faces of SAM. *Sci STKE* 2005: re7.
16. Robinson AK, Leal BZ, Chadwell LV, Wang R, Ilangoan U, et al. (2012) The Growth-Suppressive Function of the Polycomb Group Protein Polyhomeotic Is Mediated by Polymerization of Its Sterile Alpha Motif (SAM) Domain. *J Biol Chem* 287: 8702-8713.
17. Tu H, Barr M, Dong DL, Wigler M (1997) Multiple regulatory domains on the Byr2 protein kinase. *Mol Cell Biol* 17: 5876-5887.
18. Harada BT, Knight MJ, Imai S, Qiao F, Ramachander R, et al. (2008) Regulation of enzyme localization by polymerization: polymer formation by the SAM domain of diacylglycerol kinase delta1. *Structure* 16: 380-387.
19. Baron MK, Boeckers TM, Vaida B, Faham S, Gingery M, et al. (2006) An architectural framework that may lie at the core of the postsynaptic density. *Science* 311: 531-535.
20. Aviv T, Lin Z, Lau S, Rendl LM, Sicheri F, et al. (2003) The RNA-binding SAM domain of Smaug defines a new family of post-transcriptional regulators. *Nat Struct Biol* 10: 614-621.
21. Green JB, Gardner CD, Wharton RP, Aggarwal AK (2003) RNA recognition via the SAM domain of Smaug. *Mol Cell* 11: 1537-1548.
22. Slupsky CM, Gentile LN, Donaldson LW, Mackereth CD, Seidel JJ, et al. (1998) Structure of the Ets-1 pointed domain and mitogen-activated protein kinase phosphorylation site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 12129-12134.
23. Jousset C, Carron C, Boureux A, Quang CT, Oury C, et al. (1997) A domain of TEL conserved in a subset of ETS proteins defines a specific oligomerization interface essential to the mitogenic properties of the TEL-PDGFR beta oncoprotein. *Embo J* 16: 69-82.
24. Lai ZC, Rubin GM (1992) Negative control of photoreceptor development in *Drosophila* by the product of the yan gene, an ETS domain protein. *Cell* 70: 609-620.
25. Inoue T, Terada K, Furukawa A, Koike C, Tamaki Y, et al. (2006) Cloning and characterization of mr-s, a novel SAM domain protein, predominantly expressed in retinal photoreceptor cells. *BMC Dev Biol* 6: 15.
26. Matsuda T, Cepko CL (2004) Electroporation and RNA interference in the rodent retina in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 16-22.
27. Langmann T, Lai CC, Weigelt K, Tam BM, Warneke-Wittstock R, et al. (2008) CRX controls retinal expression of the X-linked juvenile retinoschisis (RS1) gene. *Nucleic Acids Res* 36: 6523-6534.
28. Sanuki R, Omori Y, Koike C, Sato S, Furukawa T (2010) Panky, a novel photoreceptor-specific ankyrin repeat protein, is a transcriptional cofactor that suppresses CRX-regulated photoreceptor genes. *FEBS Lett* 584: 753-758.
29. Kraus D, Karlstetter M, Walczak Y, Hilfinger D, Langmann T, et al. (2011) Retinal expression of the X-linked juvenile retinoschisis (RS1) gene is controlled by an upstream CpG island and two opposing CRX-bound regions. *Biochim Biophys Acta* 1809: 245-254.
30. Gehrig A, Langmann T, Horling F, Janssen A, Bonin M, et al. (2007) Genome-wide expression profiling of the retinoschisin-deficient retina in early postnatal mouse development. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48: 891-900.
31. Blackshaw S, Snyder SH (1997) Developmental expression pattern of phototransduction components in mammalian pineal implies a light-sensing function. *J Neurosci* 17: 8074-8082.
32. Tummala P, Mali RS, Guzman E, Zhang X, Mitton KP (2010) Temporal ChIP-on-Chip of RNA-Polymerase-II to detect novel gene activation events during photoreceptor maturation. *Mol Vis* 16: 252-271.
33. Meruelo AD, Bowie JU (2009) Identifying polymer-forming SAM domains. *Proteins* 74: 1-5.
34. Montana CL, Lawrence KA, Williams NL, Tran NM, Peng GH, et al. (2011) Transcriptional regulation of neural retina leucine zipper (Nrl), a photoreceptor cell fate determinant. *J Biol Chem* 286: 36921-36931.
35. Hao H, Kim DS, Klocke B, Johnson KR, Cui K, et al. (2012) Transcriptional Regulation of Rod Photoreceptor Homeostasis Revealed by In Vivo NRL Targetome Analysis. *PLoS Genet* 8: e1002649.
36. Yoshida S, Mears AJ, Friedman JS, Carter T, He S, et al. (2004) Expression profiling of the developing and mature Nrl-/- mouse retina: identification of retinal disease candidates and transcriptional regulatory targets of Nrl. *Hum Mol Genet* 13: 1487-1503.
37. Omori Y, Katoh K, Sato S, Muranishi Y, Chaya T, et al. (2011) Analysis of transcriptional regulatory pathways of photoreceptor genes by expression profiling of the Otx2-deficient retina. *PLoS One* 6: e19685.
38. Baker DA, Mille-Baker B, Wainwright SM, Ish-Horowicz D, Dibb NJ (2001) Mac mediates MAP kinase phosphorylation of Ets transcription factors in *Drosophila*. *Nature* 411: 330-334.
39. Qiao F, Song H, Kim CA, Sawaya MR, Hunter JB, et al. (2004) Derepression by depolymerization; structural insights into the regulation of Yan by Mac. *Cell* 118: 163-173.
40. Aldiri I, Vetter ML (2012) PRC2 during vertebrate organogenesis: a complex in transition. *Dev Biol* 367: 91-99.

Figure S1

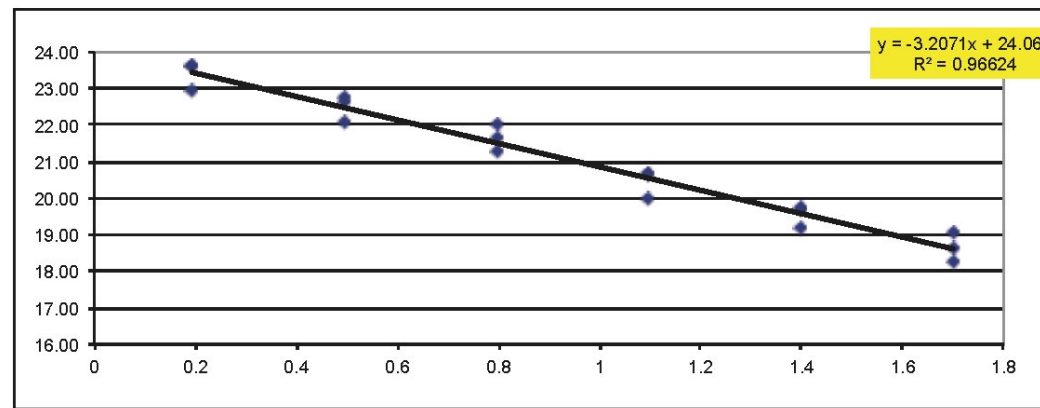
ATP5b

Sample	ng	log ng	Ct	SD
1	50	1.69897	18.79	
2	50	1.69897	18.50	
3	50	1.69897	18.14	0.81
4	25	1.39794	19.62	
5	25	1.39794	19.44	
6	25	1.39794	19.10	1.23
7	12.5	1.09691	20.59	
8	12.5	1.09691	20.15	
9	12.5	1.09691	19.92	0.34
10	6.25	0.79588	21.54	
11	6.25	0.79588	21.25	
12	6.25	0.79588	20.84	0.35
13	3.125	0.49485	22.69	
14	3.125	0.49485	21.95	
15	3.125	0.49485	21.86	0.46
16	1.5625	0.19382	22.93	
17	1.5625	0.19382	22.99	
18	1.5625	0.19382	22.59	0.21



Samd7

Sample	ng	log ng	Ct	SD
1	50	1.69897	19.09	
2	50	1.69897	18.66	
3	50	1.69897	18.28	0.79
4	25	1.39794	19.72	
5	25	1.39794	19.69	
6	25	1.39794	19.17	1.35
7	12.5	1.09691	20.68	
8	12.5	1.09691	20.64	
9	12.5	1.09691	19.99	0.39
10	6.25	0.79588	22.00	
11	6.25	0.79588	21.65	
12	6.25	0.79588	21.27	0.36
13	3.125	0.49485	22.74	
14	3.125	0.49485	22.65	
15	3.125	0.49485	22.12	0.61
16	1.5625	0.19382	23.60	
17	1.5625	0.19382	23.66	
18	1.5625	0.19382	22.97	0.38



Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Thomas Langmann, der mir mit seinem Fachwissen, seinem Engagement und seinem Ideenreichtum stets zur Seite stand. Es war mir eine große Freude, Teil seines motivierten, hilfsbereiten und aufgeschlossenen Teams zu sein. Bei Herrn Prof. Dr. Weber bedanke ich mich für seine hilfreichen wissenschaftlichen Anregungen. Mein großer Dank gilt zudem Herrn Prof. Dr. Herbert Jägle für die Übernahme des Zweitgutachtens. Besonders bedanken möchte ich mich weiterhin bei Herrn Dr. Marcus Karlstetter für seine wertvollen Hilfestellungen sowie seine Unterstützung bei der tagtäglichen Arbeit.